

# **Nachweis von *Salmonella* spp. bei Landschildkröten**

**Karola Christine Schramme**

Aus dem Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der  
Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

**Nachweis von *Salmonella* spp. bei Landschildkröten**

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

von Karola Christine Schramme  
aus  
Nördlingen

München 2000

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla  
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Hoffmann  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

*Meinen Eltern*



---

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b> |
| <b>2. SCHRIFTTUM.....</b>  | <b>3</b> |
| <b>2.1 Salmonellen.....</b>  | <b>3</b> |
| 2.1.1 Allgemein.....   | 3        |
| 2.1.1.1 Taxonomie.....   | 4        |
| 2.1.1.2 Serologische Differenzierung und Kauffmann-White-Schema.....           | 9        |
| 2.1.2 Salmonellen bei homoiothermen Tieren.....                                | 10       |
| 2.1.2.1 Salmonellen beim Menschen.....   | 10       |
| 2.1.2.2 Salmonellen bei Säugetieren.....                                       | 11       |
| 2.1.2.3 Salmonellen beim Geflügel.....   | 11       |
| 2.1.3 Salmonellen bei Reptilien.....   | 12       |
| 2.1.3.1 Allgemein.....   | 12       |
| 2.1.3.2 Salmonellennachweise bei Reptilien.....                                | 14       |
| 2.1.3.3 Das breite Keimspektrum der Salmonellen bei Reptilien.....             | 16       |
| 2.1.3.4 Häufigkeit der Salmonellen bei Reptilien allgemein.....                | 18       |
| 2.1.3.5 Salmonellen bei Schildkröten.....                                      | 21       |
| 2.1.3.6 Salmonellen bei Echsen.....  | 24       |
| 2.1.3.7 Salmonellen bei Schlangen.....   | 24       |
| 2.1.3.8 Salmonellen bei Krokodilen.....  | 26       |
| 2.1.4 Pathogenität der Salmonellen für Reptilien.....                          | 27       |
| 2.1.4.1 Übertragung und Infektionswege bei Reptilien.....                      | 28       |
| 2.1.4.2 Infektionsversuche.....  | 31       |
| 2.1.4.3 Klinische Erkrankungen und pathologisch-anatomische Veränderungen..... | 33       |
| 2.1.5 Pathogenität der Reptiliensalmonellen für den Menschen.....              | 36       |
| 2.1.5.1 Allgemein.....   | 36       |



---

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.5.2 Reptilien-assoziierte Salmonellosen .....             | 38        |
| 2.1.5.3 Übertragungswege .....                                | 39        |
| 2.1.6 Konsequenzen.....                                       | 41        |
| <b>2.2 Salmonellenanzucht und -nachweis.....</b>              | <b>48</b> |
| 2.2.1 Verfahren für den Salmonellennachweis.....              | 48        |
| 2.2.1.1 Kulturell-biochemische Methoden.....                  | 48        |
| 2.2.1.2 Andere Nachweismethoden .....                         | 51        |
| 2.2.2 Empfehlungen für den Salmonellennachweis .....          | 51        |
| 2.2.2.1 Nach § 35 LMBG.....                                   | 51        |
| 2.2.2.2 Sonstige Empfehlungen .....                           | 51        |
| 2.2.3 Salmonellen-Selektiv- und -Differenzierungsmedien ..... | 57        |
| 2.2.3.1 Flüssige Selektivanreicherungsmedien.....             | 59        |
| 2.2.3.2 Feste Selektiv- und Differenzierungsnährböden.....    | 62        |
| 2.2.4 Bebrütungszeit.....                                     | 66        |
| 2.2.5 Bebrütungstemperatur .....                              | 67        |
| 2.2.6 Reinkulturen und Laborstämme .....                      | 68        |
| <b>2.3 Zielsetzung .....</b>                                  | <b>68</b> |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>                          | <b>69</b> |
| <b>3.1 Nährmedien .....</b>                                   | <b>69</b> |
| 3.1.1 Flüssige Nährmedien .....                               | 69        |
| 3.1.1.1 Nährbouillon .....                                    | 69        |
| 3.1.1.2 Selektivanreicherungsmedien .....                     | 69        |
| 3.1.2 Feste Nährböden.....                                    | 69        |
| 3.1.2.1 Nähragar.....   | 69        |
| 3.1.2.2 Selektiv- und Differenzierungsnährböden.....          | 70        |
| 3.1.3 Lagerung der fertigen Nährmedien .....                  | 70        |
| <b>3.2 Labortests.....</b>                                    | <b>70</b> |
| 3.2.1 Gramfärbung.....  | 70        |



---

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2 Biochemische Differenzierung .....   | 71        |
| 3.2.2.1 Cytochromoxidase .....   | 71        |
| 3.2.2.2 Bunte Reihe.....   | 71        |
| 3.2.3 Serologische Differenzierung .....   | 71        |
| <b>3.3 Salmonellenstämme.....</b>  | <b>71</b> |
| 3.3.1 Salmonellenstämme vom NRL-SALM .....   | 71        |
| 3.3.2 Salmonellenstämme vom ZFF .....  | 72        |
| <b>3.4 Ermittlung einer geeigneten Inkubationstemperatur für die Selektiv-<br/>    anreicherung.....</b> | <b>74</b> |
| 3.4.1 Allgemein .....  | 74        |
| 3.4.2 Durchführung .....   | 75        |
| 3.4.2.1 Eingesetzte Selektivanreicherungsmedien.....   | 75        |
| 3.4.2.2 Untersuchte Temperaturen.....  | 75        |
| 3.4.2.3 Verwendeter Salmonellenstamm .....   | 75        |
| 3.4.2.4 Beimpfung der Selektivanreicherungsmedien .....  | 76        |
| 3.4.2.5 Bebrütung der beimpften Anreicherungsmedien.....   | 76        |
| 3.4.2.6 Keimzählung während der Bebrütungsperiode.....   | 76        |
| 3.4.3 Überprüfung weiterer Salmonellenstämme auf ihr Wachstumsverhalten in RV<br>bei 42 °C .....         | 77        |
| 3.4.3.1 Keimzahlschätzung während der Bebrütungsperiode.....   | 77        |
| 3.4.3.2 Vergleich der Zählmethode mit der Schätzmethode.....   | 78        |
| 3.4.4 Einfluss der Begleitflora auf Wachstum und Isolierbarkeit von Salmonellen .....                    | 78        |
| 3.4.4.1 Vergleich der Anzahl der Salmonellenkolonien auf N1, BPLS und<br>RAMBACH .....                   | 78        |
| 3.4.4.2 Verwendeter Salmonellenstamm .....   | 79        |
| 3.4.4.3 Verwendete Selektivanreicherungsmedien .....   | 79        |
| 3.4.4.4 Beimpfung mit Salmonellen und Begleitflora .....   | 79        |
| <b>3.5 Ermittlung geeigneter Selektiv- und Differenzierungsnährböden .....</b>                           | <b>80</b> |



---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.6 Probennahme und Kotuntersuchung</b> .....   | <b>80</b> |
| 3.6.1 Herkunft der untersuchten Kotproben .....  | 80        |
| 3.6.1.1 Schildkrötenbestände .....   | 80        |
| 3.6.1.2 Kotproben von Echsen .....   | 81        |
| 3.6.2 Probennahme .....  | 81        |
| 3.6.3 Aufbewahrung und Transport der Kotproben .....   | 83        |
| 3.6.4 Untersuchung der Kotproben im Labor.....   | 83        |
| 3.6.4.1 Direktausstrich .....  | 83        |
| 3.6.4.2 Anreicherung.....  | 83        |
| 3.6.4.3 Weitere Differenzierung .....  | 83        |
| <b>4. ERGEBNISSE</b> .....   | <b>86</b> |
| <b>4.1 Ermittlung einer geeigneten Inkubationstemperatur für die Selektiv-</b><br><b>anreicherung</b> .....  | <b>86</b> |
| 4.1.1 Wachstum des Versuchsstammes bei verschiedenen Temperaturen.....                                       | 86        |
| 4.1.1.1 In Abhängigkeit von verschiedenen Anreicherungsmedien .....  | 86        |
| 4.1.1.2 Wachstumsvergleich bei verschiedenen Temperaturen.....   | 90        |
| 4.1.1.3 Genauere Betrachtungen zur Anzucht des Versuchsstammes in RV bei 42 °C                               | 92        |
| 4.1.2 Wachstumsverhalten weiterer Salmonellenstämmen in RV bei 42 °C .....                                   | 93        |
| 4.1.2.1 Vergleich der zwei verwendeten Methoden zur Bestimmung der Keimzahl ...                              | 93        |
| 4.1.2.2 Ergebnis des ersten Anzuchtversuches weiterer Salmonellenstämmen in<br>RV bei 42 °C .....            | 94        |
| 4.1.2.3 Subspezieszugehörigkeit der beim ersten Versuch nicht gewachsenen<br>Stämme .....                    | 95        |
| 4.1.2.4 Wachstumsfähigkeit der getesteten Salmonellenstämmen in RV bei 42 °C<br>bei einmaliger Anzucht ..... | 95        |
| 4.1.2.5 Wachstumsfähigkeit der Versuchsstämme in RV bei 42 °C nach mehreren<br>Ansätzen.....                 | 96        |
| 4.1.3 Einfluss der Begleitflora auf das Wachstum von Salmonellen .....                                       | 96        |



---

|   |            |
|---|------------|
| 4.1.3.1 Vergleich der Anzahl der Salmonellenkolonien auf N1, BPLS und<br>RAMBACH .....                              | 96         |
| 4.1.3.2 Koloniezählung von Salmonellen und Begleitflora.....  | 96         |
| 4.1.3.3 Wachstumsvermögen von Salmonellen und Begleitflora in RV bei 41 °C.....                                     | 97         |
| 4.1.3.4 Wachstumsvermögen von Salmonellen und Begleitflora in S bei 37 °C .....                                     | 98         |
| 4.1.3.5 Identifikation der Begleitflora.....  | 98         |
| <b>4.2 Ermittlung geeigneter Selektiv- und Differenzierungsnährböden .....</b>                                      | <b>101</b> |
| 4.2.1 Koloniemorphologie von Salmonellenreinkulturen auf verschiedenen<br>Nährböden .....                           | 101        |
| 4.2.1.1 Unbeimpfte Nährböden.....   | 101        |
| 4.2.1.2 Koloniemorphologie und Aussehen der Nährböden bei Salmonellen<br>mit „typischer“ Kolonienmorphologie.....   | 102        |
| 4.2.1.3 Koloniemorphologie und Aussehen der Nährböden bei Salmonellen<br>mit „untypischer“ Kolonienmorphologie..... | 105        |
| 4.2.2 Morphologie der 86 getesteten Salmonellenstämmen auf den eingesetzten<br>Nährböden .....                      | 105        |
| 4.2.2.1 Anteil typisch gewachsener Salmonellenstämmen auf dem jeweiligen<br>Nährboden.....                          | 105        |
| 4.2.2.2 Typische Morphologie bei den verschiedenen Salmonellen-Subspezies .....                                     | 106        |
| <b>4.3 Überprüfung der Anzuchtbedingungen mittels Kotuntersuchungen .....</b>                                       | <b>109</b> |
| 4.3.1 Untersuchte Kotproben.....  | 109        |
| 4.3.2 Identifizierung der positiven Proben .....  | 109        |
| 4.3.3 Untersuchung der Nährböden nach Bebrütung .....   | 110        |
| 4.3.3.1 Positive Proben .....   | 110        |
| 4.3.3.2 Negative Proben.....  | 113        |
| <b>4.4 Kotuntersuchung.....</b>   | <b>117</b> |
| 4.4.1 Einmalige Kotuntersuchung .....   | 117        |
| 4.4.1.1 Salmonellenisolate .....  | 117        |
| 4.4.1.2 Genauere Betrachtung der beiden Bestände der Zoohandlung.....   | 118        |



---

|   |            |
|---|------------|
| 4.4.1.3 Salmonelleninzidenz .....   | 120        |
| 4.4.2 Wiederholungsuntersuchung .....   | 120        |
| 4.4.3 Vergesellschaftung von Schildkröten mit Echsen .....  | 121        |
| <b>4.5 Verteilung der Salmonellen-Subspezies auf die verschiedenen Reptilien-</b><br><b>gruppen .....</b>   | <b>121</b> |
| <b>5. DISKUSSION.....</b>   | <b>124</b> |
| <b>5.1 Besprechung der Methoden .....</b>   | <b>124</b> |
| 5.1.1 Verwendete Salmonellenstämme .....  | 124        |
| 5.1.2 Für die Bestimmung der Keimzahl angewendete Methoden .....  | 124        |
| 5.1.2.1 Zählmethode .....   | 124        |
| 5.1.2.2 Schätzmethode .....   | 125        |
| 5.1.3 Gewählte Zeitschritte.....  | 125        |
| 5.1.4 Getestete Temperaturstufen.....   | 126        |
| 5.1.5 Ausgewählte Nährmedien .....  | 126        |
| 5.1.5.1 Flüssige Anreicherungsmedien.....   | 126        |
| 5.1.5.1.1 Voranreicherung.....  | 126        |
| 5.1.5.1.2 Selektivanreicherungsmedien.....  | 126        |
| 5.1.5.2 Feste Selektiv- und Differenzierungsnährböden.....  | 127        |
| 5.1.6 Methode der Identifizierung salmonellenpositiver Kotproben.....                                       | 127        |
| 5.1.7 Beurteilung der Nährböden nach ihrer Eignung für die Identifikation von<br>Reptiliensalmonellen ..... | 128        |
| 5.1.8 Nährbodenauswahl für Kotuntersuchung.....   | 129        |
| <b>5.2 Besprechung der Ergebnisse .....</b>   | <b>130</b> |
| 5.2.1 Ermittlung einer geeigneten Inkubationstemperatur für die Selektiv-<br>anreicherung .....             | 130        |
| 5.2.1.1 Wachstumsverlauf des Versuchsstammes NRL-SALM 2509.....   | 130        |
| 5.2.1.2 Wachstumsverhalten von weiteren Versuchsstämmen bei 42 °C in RV .....                               | 131        |
| 5.2.1.3 Fazit.....  | 131        |



---

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.2 Einfluss der Begleitflora auf das Wachstum und die Isolierbarkeit von<br>Salmonellen aus dem Selektivanreicherungsmedium ..... | 133        |
| 5.2.3 Ermittlung geeigneter Selektiv- und Differenzierungsnährböden.....   | 136        |
| 5.2.3.1 Ergebnis des Experimentes mit Reinkulturen.....  | 136        |
| 5.2.3.2 Ergebnis der Kotuntersuchung.....  | 138        |
| 5.2.3.2.1 Feste Selektiv- und Differenzierungsmedien .....   | 138        |
| 5.2.3.2.2 Flüssige Selektivanreicherungsmedien .....   | 141        |
| 5.2.4 Salmonelleninzidenz bei den einzelnen Reptiliengruppen.....  | 144        |
| 5.2.5 Salmonelleninzidenz der in dieser Studie untersuchten Schildkröten.....  | 145        |
| 5.2.6 Herkunft der salmonellenpositiven Schildkröten .....   | 146        |
| <b>5.3 Resümee .....</b>   | <b>148</b> |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>150</b> |
| <b>7. SUMMARY.....</b>   | <b>152</b> |
| <b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>  | <b>154</b> |
| <b>9. TABELLENANHANG.....</b>  | <b>168</b> |
| <b>DANKSAGUNG</b>  |            |
| <b>LEBENS LAUF</b>   |            |



## TABELLENVERZEICHNIS

|  |     |
|--|-----|
| Tab. 1: Häufigkeit von Salmonellen bei verschiedenen Reptilien ohne Angabe bestimmter Tierarten.....   | 21  |
| Tab. 2: Häufigkeit von Salmonellen bei Schildkröten.....   | 23  |
| Tab. 3: Häufigkeit von Salmonellen bei Echsen.....   | 25  |
| Tab. 4: Häufigkeit von Salmonellen bei Schlangen.....  | 26  |
| Tab. 5: Häufigkeit von Salmonellen bei Krokodilen.....   | 27  |
| Tab. 6: Verschiedene Verfahren der Salmonellenanzucht aus Reptilien.....   | 54  |
| Tab. 7: Verschiedene Verfahren der weiteren Differenzierung von salmonellenverdächtigen Kolonien aus Reptilien.....                          | 56  |
| Tab. 8: Salmonellenstämme des NRL-SALM.....  | 72  |
| Tab. 9: Salmonellenstämme vom ZFF.....   | 73  |
| Tab. 10: Untersuchte Schildkröten, nach Tierart, Herkunft und Bestand getrennt aufgelistet.....  | 82  |
| Tab. 11: Aussehen der Nährböden und Morphologie von typischen und untypischen Salmonellenkolonien nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C..... | 102 |
| Tab. 12: Anzahl und prozentualer Anteil der typisch gewachsenen Salmonellenstämme auf den neun getesteten Nährböden.....                     | 106 |
| Tab. 13: Zeitpunkt der Identifizierung der insgesamt 22 salmonellenpositiven Proben.....   | 110 |
| Tab. 14: Direktausstrich der 22 salmonellenpositiven Proben, Auswertung der Nährböden.....   | 111 |
| Tab. 15: Anreicherung von 22 salmonellenpositiven Proben in RV, Auswertung der Nährböden.....  | 112 |
| Tab. 16: Anreicherung von 19 salmonellenpositiven Proben in S, Auswertung der Nährböden.....   | 113 |
| Tab. 17: Direktausstrich der 150 salmonellennegativen Proben, Auswertung der Nährböden.....  | 114 |



|  |     |
|--|-----|
| Tab. 18: Anreicherung von 150 salmonellennegativen Proben in RV, Auswertung<br>der Nährböden.....  | 115 |
| Tab. 19: Anreicherung von 94 salmonellennegativen Proben in S, Auswertung der<br>Nährböden.....  | 116 |
| Tab. 20: Salmonellenisolate bei einmaliger Kotuntersuchung von 167 Schildkröten.....   | 117 |
| Tab. 21: Zusammenstellung der salmonellenpositiven Einzeltieren (ET) und der<br>beiden Bestände der Zoohandlung mit den Verkaufstieren (B9) und den<br>privaten Tieren (B10), nach Terrarien (T) getrennt..... | 119 |
| Tab. 22: Anzahl und prozentualer Anteil der verschiedenen Subspezies bei den<br>einzelnen Tiergruppen.....   | 122 |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |     |
|--|-----|
| Abb. 1: Einteilung der rezenten Reptilien nach COOPER (1997).....  | 12  |
| Abb. 2: Schematische Darstellung des Salmonellennachweises nach den Empfehlungen<br>der Amtlichen Sammlung L 00.00-20 (1998) nach § 35 LMBG.....     | 52  |
| Abb. 3: Systematik und Einteilung der untersuchten Landschildkröten gemäß<br>OBST (1988).....  | 82  |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der verwendeten Anreicherungsmedien und<br>Nährböden und deren Kombinationen für die Anzucht der 172 Kotproben..... | 84  |
| Abb. 5: Wachstum in R, RV und S bei 28 °C.....   | 87  |
| Abb. 6: Wachstum in R, RV und S bei 32 °C.....   | 87  |
| Abb. 7: Wachstum in R, RV und S bei 35 °C.....   | 88  |
| Abb. 8: Wachstum in R, RV und S bei 37 °C.....   | 88  |
| Abb. 9: Wachstum in R, RV und S bei 40 °C.....   | 89  |
| Abb. 10: Wachstum in R, RV und S bei 42 °C.....  | 89  |
| Abb. 11: Wachstum in R bei verschiedenen Temperaturen.....   | 91  |
| Abb. 12: Wachstum in RV bei verschiedenen Temperaturen.....  | 91  |
| Abb. 13: Wachstum in S bei verschiedenen Temperaturen.....   | 92  |
| Abb. 14: Wachstum in RV bei Temperaturen um 42 °C.....   | 93  |
| Abb. 15: Wachstum von 65 Salmonellenstämmen bei 42 °C in RV nach 12, 24 und<br>48 Stunden.....   | 94  |
| Abb. 16: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot<br>von Schildkröte 1 in RV bei 41 °C.....                              | 99  |
| Abb. 17: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot<br>von Schildkröte 2 in RV bei 41 °C.....                              | 99  |
| Abb. 18: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot<br>von Schildkröte 1 in S bei 41 °C.....                               | 100 |
| Abb. 19: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot<br>von Schildkröte 2 in S bei 41 °C.....                               | 100 |
| Abb. 20: Verhältnis der auf den neun verschiedenen Nährböden typisch gewachsenen zu  |     |



|   |     |
|---|-----|
| den untypisch gewachsenen Salmonellenstämmen, nach Subspezies aufgeteilt....                                | 108 |
| Abb. 21: Anteil der einzelnen Tiergruppen an der Gesamtzahl der salmonellenpositiven Tieren (gerundet)..... | 122 |
| Abb. 22: Vorkommen der verschiedenen Salmonellen-Subspezies bei den einzelnen Tiergruppen.....              | 123 |



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|           |   |
|-----------|---|
| BPLS:     | Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar                  |
| DCLS:     | Desoxycholat-Citrat-Lactose-Saccharose-Agar                     |
| HE:       | Hektoen-Entero-Agar   |
| LMBG:     | Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz                      |
| MLCB:     | Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brillantgrün-Agar                  |
| N1:       | Standard 1-Nähragar   |
| NRL-SALM: | Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Salmonellen |
| PFGE:     | Pulsfeld-Gel-Elektrophorese                                     |
| R:        | Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT                 |
| RV:       | Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS |
| S:        | Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon                            |
| SS:       | Salmonella-Shigella-Agar  |
| WS:       | Wismutsulfit-Agar   |
| ZFF:      | Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten   |



## 1. EINLEITUNG

In jüngster Zeit erschienen auch im deutschsprachigen Raum Berichte über Krankheitsfälle beim Menschen durch Salmonellen, die von als Haustiere gehaltenen Reptilien übertragen wurden. Sogenannte Reptilien-assoziierte Salmonellosen sind in den USA seit über 30 Jahren bekannt, wo sie aufgrund der weitverbreiteten Reptilienhaltung ein beachtliches Gesundheitsproblem darstellten. Vor allem Kleinkinder, ältere Leute und anderweitig immunsupprimierte Personen sind – wie bei den meisten Infektionskrankheiten – besonders anfällig.

Reptilien beherbergen sehr häufig Salmonellen, ohne daran zu erkranken; sie bilden ein natürliches Reservoir für diese Bakterien, scheiden sie unbemerkt aus und sind eine Infektionsquelle für den Menschen. Versuche, Salmonellen aus infizierten Reptilien und deren Umgebung zu eliminieren, scheiterten. Die einzige wirkungsvolle Möglichkeit, sich vor Ansteckung zu schützen, ist angemessene Hygiene bei der Reptilienhaltung allgemein und bei salmonellenpositiven Tieren im Besonderen.

Die meisten Reptilien zeigen bei einer Salmonelleninfektion keine Krankheitssymptome und erregen deshalb keinen Verdacht; die einzige sinnvolle Maßnahme zur Abklärung ist eine bakteriologische Kotuntersuchung.

In der Literatur wurde sehr viel geschrieben über Nachweismethoden für Salmonellen aus Wurst, Hackfleisch, Eiern, Milch, Wasser und anderen Lebensmitteln; für den Salmonellenachweis daraus gibt es sogar genaue Anweisungen. Auch über Salmonellenisolierung aus menschlichen und tierischen Fäzes, Einstreu und Abwasser liegen viele Hinweise in der Literatur vor. Studien, die sich mit der Nachweismethode von Salmonellen bei Reptilien befassen, gibt es jedoch nur wenige.

So stellt sich hier nun die Frage, ob Salmonellen aus den poikilothermen Reptilien mit den gleichen Nachweisverfahren diagnostiziert werden können, die für die Isolierung von Salmonellen aus den homoiothermen Säugern oder Vögeln angewendet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, für die Salmonellendiagnostik allgemein übliche Methoden und Nährmedien auf ihre Eignung für die Isolation von Salmonellen aus Reptilien zu prüfen und Verbesserungsvorschläge zu machen, insbesondere in Hinblick auf eine geeignete Bebrü-



tungstemperatur und die Verwendung von Nährmedien, die das Entdecken von solchen Salmonellen ermöglichen, die speziell bei Reptilien häufig vorkommen.

Dazu werden Erkenntnisse, die im Labor durch Untersuchung von Salmonellenstämmen, die aus Reptilien isoliert worden waren, gewonnen wurden, in einer Feldstudie vertieft und verglichen.

Die vorliegende Untersuchung von 167 Landschildkröten soll eine Aussage über die Salmonelleninzidenz dieser Tiere in Privathand und Zoohandel sowie bei Nachzuchtieren und Wildfängen ermöglichen.



## 2. SCHRIFTTUM

### 2.1 SALMONELLEN

#### 2.1.1 Allgemein

Salmonellen sind 2-3  $\mu\text{m}$  lange, plumpe und normalerweise aufgrund peritricher Begeißelung lebhaft bewegliche, fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen. Ausnahmsweise kann bei einzelnen Typen der Geißelapparat dauernd oder vorübergehend verloren sein; diese sind dann unbeweglich.

Verbreitet sind Salmonellen weltweit. Ihr natürliches Habitat ist der Darmtrakt von homoiothermen und vielen poikilothermen Tieren, bei denen sie mehr oder weniger schwere Enteritiden hervorrufen können. Sie werden mit dem Kot in die Umwelt ausgeschieden, wo sie – vor Sonnenlicht geschützt – sehr lange überleben und sich auch noch vermehren können. Zum Beispiel werden für die Überlebenszeit in Gülle über neun Monate, in Erde über 16 Monate und in getrocknetem Kot sogar über 30 Monate angegeben (BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; ROLLE & MAYR, 1993; GEUE & LÖSCHNER, 2002).

Die Ansteckung erfolgt normalerweise oral durch Aufnahme kontaminierter Lebens- bzw. Futtermittel oder durch Schmierinfektion. Je nach der Größe der aufgenommenen Keimdosis, der Virulenz des Erregers und der körpereigenen Abwehr kommt es zu einer latenten Infektion oder zum Krankheitsausbruch.

Latente Infektionen können jederzeit durch belastende Einflüsse wie Stress, Transport, ungünstige Witterung, andere Krankheiten, Trächtigkeit, Futterumstellung, zu dichte Haltung o.ä. manifest werden; latente Träger scheiden über längere Zeit oder dauernd Salmonellen aus und stellen somit eine ständige Infektionsquelle für andere Tiere und den Menschen dar.

Genesene Individuen scheiden die Salmonellen ebenfalls noch über einen gewissen Zeitraum hinweg aus; sie können auch zu Dauerausscheidern werden.

Im Krankheitsfall werden die Erreger massenhaft ausgeschieden, normalerweise über den Kot, manchmal aber auch über Harn und Sperma, bei einer Salmonellenpneumonie über



Bronchialschleim und bei einem Salmonellenabort über Eihäute, Fetus und Fruchtwasser. Des Weiteren wurden Salmonellen auch schon aus Abszesseiter isoliert (ROLLE & MAYR, 1993). Überträger sind außer an Salmonellose erkrankten Individuen latent infizierte Tiere im Bestand oder neu eingestellte Tiere. Doch auch Kleintiere wie Ratten und Mäuse, Vögel wie verwilderte Haustauben, Enten, Möwen, Krähen und Spatzen und – vor allem in Lebensmittelbetrieben – Insekten wie Schaben, Fliegen und Ameisen können Salmonellen beherbergen und weiterverbreiten. Sogar aus Igel, Fröschen und Fischen konnten Salmonellen schon nachgewiesen werden. Der Infektionsgrad solcher Überträgertiere ist umso höher, je enger ihr Kontakt zu Schlacht- und Viehhöfen, Müllhalden, Kläranlagen und abwasserführenden Hafenbecken ist (ANG et al., 1973; ROLLE & MAYR, 1993; TSCHÄPE & KÜHN, 1995; WOODWARD et al., 1997).

Die Bedeutung der Salmonellen besteht außer in finanziellen Verlusten bei seuchenhaften Ausbrüchen in Viehherden hauptsächlich in der Infektionsgefährdung des Menschen durch die Kontamination von Nahrungsmitteln; diese können entweder direkt von infizierten Tieren stammen oder bei der weiteren Verarbeitung sekundär kontaminiert werden (CHIODINI & SUNDBERG, 1981; BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; ROLLE & MAYR, 1993).

#### **2.1.1.1 Taxonomie**

Die Gattung *Salmonella* gehört mit mehreren anderen Gattungen zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Es handelt sich dabei um sporenlose, fakultativ anaerobe, gerade, gramnegative Stäbchen. Derzeit sind über 2400 Salmonellenserovare bekannt. Über Nomenklatur und Einteilung der Salmonellen sind sich Wissenschaftler bis heute nicht ganz einig, schon in der Vergangenheit unterlagen sie zahlreichen Veränderungen.

Durch DNA-Hybridisierung stellte man fest, dass alle Salmonellen in zwei Spezies einzuordnen sind. Nach der heute allgemein gebräuchlichen, wissenschaftlich fundierten und von den meisten Bakteriologen verwendeten, offiziell aber nicht anerkannten Nomenklatur werden diese zwei Spezies *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* genannt. Die Spezies *Salmonella enterica* lässt sich biochemisch und genotypisch weiterhin in sechs Subspezies unterteilen (BOCKEMÜHL, 1992; BRENNER et al., 2000):



- *Subspecies enterica* (I) enthält die meisten für Menschen und homoiotherme Tiere bedeutsamen Serovare
- *Subspecies salamae* (II)
- *Subspecies arizonae* (IIIa)
- *Subspecies diarizonae* (IIIb)
- *Subspecies houtenae* (IV)
- *Subspecies indica* (VI)

Die Spezies *Salmonella bongori* war früher die Subspezies V der einzigen Spezies *Salmonella enterica*; erst vor einigen Jahren wurde sie in den Rang einer Spezies erhoben. Zur Vermeidung von Verwirrung wird die Nummerierung *Salmonella bongori* (V) und *Salmonella indica* (VI) beibehalten, obwohl *Salmonella bongori* jetzt eine eigene Spezies ist.

Nach dieser Nomenklatur lautet der volle Name des Erregers des Typhus des Menschen beispielsweise: *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Typhi, oder *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Ser. Typhi. Die Kurzform *Salmonella* Typhi ist zugelassen.

Die im Bacteriological Code von 1990 offiziell festgelegte, aber kaum benutzte Nomenklatur lautet folgendermaßen (EUZÉBY, 1999):

- *Salmonella bongori*
- *Salmonella choleraesuis* Subspez. *arizonae*
- *Salmonella choleraesuis* Subspez. *choleraesuis*
- *Salmonella choleraesuis* Subspez. *diarizonae*
- *Salmonella choleraesuis* Subspez. *houtenae*
- *Salmonella choleraesuis* Subspez. *salamae*
- *Salmonella enteritidis*
- *Salmonella typhi*
- *Salmonella typhimurium*

Die letzten drei „Spezies“ stellen eigentlich Serovare dar; wegen ihrer großen Bedeutung für den Menschen wurden sie aber offiziell in den Speziesrang erhoben. Der Name *Salmonella choleraesuis* wurde, obwohl er schon für ein Serovar vergeben ist, deshalb als Speziesname gewählt, weil es der Referenzstamm des Genus *Salmonella* ist. Der Vorschlag, den Speziesnamen in *Salmonella enterica* zu ändern, um Verwechslungen zu vermeiden, da dieser noch



an kein Serovar vergeben ist, wurde von der Judicial Commission abgelehnt; ebenso wurde abgelehnt, den Serovaren *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* und *Salmonella typhimurium* den Speziesrang abzuspochen und sie in die Subspezies *Salmonella enterica* einzureihen, wo sie nach wissenschaftlichen Erkenntnissen stehen müssten.

Weiterhin wurden früher alle neu entdeckten Serovare mit einem eigenen Namen belegt, da man sie fälschlicherweise für neue Spezies gehalten hat; dieser Name gibt meistens den Ort der Erstisolierung an, z.B. *Salmonella* Dublin oder *Salmonella* Heidelberg; selten beschreibt er aber auch ein Symptom, z.B. *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Choleraesuis oder *Salmonella* Abortusequi. So existierten sehr viele verschiedene „Spezies“-Namen. Um deutlich zu machen, dass die Serovare keinen Speziesrang besitzen, sollen sie mit einem Großbuchstaben beginnen und nicht kursiv geschrieben werden.

Heute hat man sich darauf geeinigt, bei der Befundübermittlung nur bei der Subspezies I bei einer Namensnennung zu bleiben, z.B. *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Ser. Typhimurium; die übrigen Subspezies werden mit römischen Zahlen von II-VI nach dem Artnamen und der Antigenformel gekennzeichnet (BOCKEMÜHL, 1992; ROLLE & MAYR, 1993; BRENNER et al., 2000).

Aufgrund der im folgenden Schrifttum verwendeten älteren Literatur müssen noch zwei Hinweise gegeben werden:

1. Verständlicherweise konnten sich Autoren vor 40 Jahren nicht an Regeln halten, die erst vor zehn Jahren aufgestellt wurden. Deshalb stimmen alte Bezeichnungen und die frühere Einteilung der Salmonellen nicht vollkommen mit der heute gültigen Taxonomie überein; dadurch wird es schwieriger, einen Überblick über das Vorkommen der verschiedenen Salmonellen bei Reptilien zu bekommen. Aus diesem Grund werden – nur zur Information – noch zwei weitere veraltete Salmonelleneinteilungen vorgestellt, die für das Verständnis im weiteren Verlauf dieser Arbeit wertvoll sind:

KAUFFMANN (1964) spricht von drei Subgenera im Genus *Salmonella*, die er folgendermaßen einteilt:

- Subgenus I = typische *Salmonella*-Bakterien
- Subgenus II = atypische *Salmonella*-Bakterien
- Subgenus III = Arizona-Bakterien = *Salmonella arizonae*



LIE (1968) zählt vier Subgenera auf, die sich biochemisch unterscheiden:

- Subgenus I = typische Salmonellen
- Subgenus II = atypische Salmonellen
- Subgenus III = Arizona-Bakterien
- Subgenus IV = atypische Subgenus II-Salmonellen, die in biochemischer und serologischer Hinsicht von typischen Subgenus II-Salmonellen abweichen

2. Weiterhin muss erwähnt werden, dass Arizonakeime früher eine eigenständige Gruppe innerhalb der *Enterobacteriaceae* darstellten, die mit Salmonellen zwar eng verwandt ist, sich aber biochemisch von diesen unterscheidet (EDWARDS et al., 1959).

Die erste Isolierung eines Arizonakeimes geschah 1939 von CALDWELL & RYERSON aus Echsen aus Arizona. Er wurde „*Salmonella* sp. (Dar-es-Salaam type, var. from Arizona)“ genannt, weil er – wie der „echte Dar-es-Salaam Typ“ – Gelatine verflüssigt, obwohl er antigenetisch mit diesem wenig gemeinsam hat (EDWARDS et al., 1959).

Später wurde er, trotz der Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen und Laktose zu spalten, wegen der engen Antigenverwandtschaft zu den H-Antigenen der Salmonellen in das Genus *Salmonella* aufgenommen und „*Salmonella arizona*“ genannt (HINSHAW & MCNEIL, 1944; EDWARDS et al., 1959).

Im Lauf der Zeit wurden mehrere ähnliche Organismen in den USA und anderen Ländern entdeckt, z.B. aus Geflügel, Eipulver, Reptilien – v.a. Schlangen, aber auch Echsen und Schildkröten – anderen Tieren und dem Menschen; bei diesem kann er bei Vorkommen im Stuhl akute Diarrhoe und Gastroenteritis, bei Invasion in die Blutbahn enterisches Fieber verursachen. Dreißig Prozent der menschlichen Arizona-Isolate stammen nicht aus Stuhlproben, sondern aus Organen und Körperflüssigkeiten.

Das bringt die Frage mit sich, ob diese Keime wirklich so invasiv sind, oder ob sie wegen ihrer Fähigkeit, Laktose zu spalten, in Stuhlproben oft übersehen werden (EDWARDS et al., 1959). HABERMALZ & PIETZSCH (1973) stimmen in Hinblick auf die Pathogenität der Arizonakeime ihrer Integration in das Genus *Salmonella* zu, erwarten aber Schwierigkeiten bei der Diagnose wegen ihrer Fähigkeit zur Laktose-spaltung.



Aufgrund dieser biochemischen Unterschiede waren Arizonakeime früher nicht in das Genus *Salmonella* aufgenommen, und noch lange nach ihrer Integration sprechen viele Autoren von Arizonakeimen und Salmonellen und erwähnen sie getrennt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfachheit halber der Ausdruck „Arizonakeime“ als Synonym für „Subspezies III-Salmonellen“ übernommen, wenn betont werden soll, dass diese Subspezies gemeint ist.

Morphologisch sind Salmonellen untereinander und von anderen *Enterobacteriaceae* nicht zu unterscheiden. Die Differenzierung erfolgt kulturell-biochemisch in einer „Bunten Reihe“ und serologisch aufgrund unterschiedlicher Antigenstrukturen (BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; ROLLE & MAYR, 1993):

O-Antigen: somatisches Antigen, zellwandständiges, hitzestabiles Lipopolysaccharid; „O“ bedeutet Wachstum „ohne Hauch“

H-Antigen: Geißelantigen, in den Geißeln sitzendes, hitzelabiles Proteinantigen; „H“ bedeutet „hauchförmiges Wachstum“

Die Bezeichnung „O“- und „H“-Antigen geht historisch auf die Beobachtung zurück, dass Bakterien der Gattung *Proteus* wegen ihrer starken Beweglichkeit aufgrund ihrer Begeißelung einen Nährboden vollständig mit einem dünnen Bakterienrasen – gleichsam „hauchförmig“ – überziehen. Der Ausdruck „H-Antigen“ für die Geißelantigene beruht auf der Beobachtung des hauchförmigen Wachstums bei begeißelten Bakterien. Unbegeißelte und somit unbewegliche Varianten wachsen in umschriebenen Kolonien „ohne Hauch“. Diese Bakterien besitzen nur zellwandständige Antigene, für die die Bezeichnung „O-Antigen“ für Wachstum „ohne Hauch“ abgeleitet wurde.

Außerdem können bei Salmonellen noch folgende Antigene vorkommen:

Vi-Antigen: gehört zu den Kapselantigenen, ist als Bauelement der Mikrokapsel der eigentlichen Zellwand aufgelagert, besitzt Polysaccharidstruktur und kann den Nachweis des O-Antigens stören, kommt aber nur bei wenigen Stämmen vor, z.B. *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C oder *Salmonella* Dublin; „Vi“ wurde von „Virulenz“ abgeleitet



F-Antigen: ist ein Hüllantigen, das ebenfalls die O-Agglutination stören kann; kommt auch nur bei wenigen Stämmen vor; „F“ steht für „Fimbrien“

### 2.1.1.2 Serologische Differenzierung und Kauffmann-White-Schema

Jedes Serovar besitzt mehrere Partialantigene.

Die O-Antigene werden mit arabischen Ziffern bezeichnet (1, 2, 3 usw.). In der Regel weisen Salmonellen mehrere verschiedene O-Antigene auf. Stämme mit gleichem Haupt-O-Antigen werden in O-Antigengruppen zusammengefasst, die mit großen lateinischen Buchstaben von A bis Z und im Weiteren mit arabischen Zahlen von 51 bis 67 gekennzeichnet werden; zur Zeit existieren 51 Serogruppen und -untergruppen. Die sog. Minor-O-Antigene treten bei mehreren Gruppen auf und sind deshalb für die serologische Differenzierung nicht geeignet.

Salmonellen der gleichen serologischen Gruppe, die also gleiche Haupt-O-Antigene besitzen, können anhand der H-Antigene weiter differenziert werden; diese können in zwei unterschiedlichen serologischen Zustandsformen vorliegen: Die H-Antigene der Phase 1 sind die sogenannte spezifische Phase, weil sie die Identifizierung des einzelnen Serovars ermöglichen; sie werden mit kleinen lateinischen Buchstaben bezeichnet (a, b, c usw.). Die H-Antigene der Phase 2 sind die sogenannte unspezifische Phase, da sie bei mehreren Serovaren nachweisbar und somit für die serologische Differenzierung nicht geeignet sind; sie werden mit arabischen Ziffern bezeichnet (1, 2, 3 usw.). Neben biphasischen können auch mono- oder triphasische Varianten auftreten.

Mittels spezifischer Antigenseren gegen die O- und H-Antigene ergibt sich eine Antigenformel, die zusammen mit der lateinischen Bezeichnung der heute bekannten Serovare im Kauffmann-White-Schema niedergelegt ist (POPOFF & LE MINOR, 1997). Das Kauffmann-White-Schema ist eine vereinfachte diagnostische Antigentabelle und kein Verzeichnis aller nachweisbaren Antigene (KAUFFMANN, 1964).

Es existieren Serovare, die sich trotz gleicher Antigenformeln biochemisch unterscheiden und somit unterschiedlichen Subspezies zugeordnet werden müssen (BLOBEL & SCHLIESSER, 1981).

In der Antigenformel werden die O-Antigene und die H-Antigene der Phasen 1 und 2 durch Doppelpunkt getrennt dargestellt. Die vollständige Antigenformel für *Salmonella* Paratyphi B



beispielsweise lautet demnach: 1,4,5,12:b:1,2. Durch diese Antigenformeln ist jedes Serovar einwandfrei identifiziert. Bisher sind im Kauffmann-White-Schema 51 Serogruppen mit über 2400 Serovaren erfasst (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; ROLLE & MAYR, 1993; BRENNER et al., 2000).

## **2.1.2 Salmonellen bei homoiothermen Tieren**

### **2.1.2.1 Salmonellen beim Menschen**

Beim Menschen treten zwei ganz verschiedene Krankheitsbilder auf:

Die primär für den Menschen pathogenen, an ihn angepassten Serovare *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi B, seltener auch *Salmonella* Paratyphi A und C, verursachen zyklisch verlaufende, schwere Allgemeininfektionen mit länger anhaltendem, hohem Fieber, Septikämie, Benommenheit und Organmanifestation, und nur sekundär Darmsymptome. Die Inkubationszeit beträgt zwischen zehn und 21 Tage, die Infektionsdosis ist mit ca.  $10^3$  Keimen relativ gering. Die Übertragung kann außer über kontaminierte Lebensmittel auch direkt von einem Erkrankten auf einen Gesunden erfolgen. Nach der Genesung bleiben viele Menschen Dauerausscheider.

Primär für Tiere pathogene Salmonellen oder solche ohne spezielle Wirtsanpassung, Enteritis-Salmonellen oder auch Lebensmittelvergifter genannt, rufen gastroenteritische Krankheitssymptome hervor, die mit Erbrechen, Durchfall und mehr oder weniger hohem Fieber einhergehen. Die Inkubationszeit ist kurz, sie beträgt nur wenige Stunden bis 3 Tage, die Infektionsdosis mit ca.  $10^6$  Keimen jedoch groß. Die Krankheit dauert meist nur einige Tage und ist selbstlimitierend, benötigt daher in der Regel keine antibiotische Behandlung. Bei kleinen Kindern können allerdings typhöse Krankheitsbilder auftreten. (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; HRÚZIK, 1983; BOCKEMÜHL, 1992).



### 2.1.2.2 Salmonellen bei Säugetieren

Auch hier kann man unterscheiden zwischen Serovaren, die an die einzelnen Tierarten angepasst sind und dort spezifische Erkrankungen hervorrufen, während sie für andere Tierarten nahezu bedeutungslos sind, und anderen, die an keinen Wirt besonders angepasst sind und bei allen Tierarten Enteritiden verursachen.

Generell sind alle Säugetierarten für Salmonelleninfektionen empfänglich, wenn auch Hund und Katze eine relativ große Resistenz dagegen besitzen. Jede Altersstufe ist betroffen, jedoch erkranken Jungtiere häufiger und schwerer als ausgewachsene Tiere, bei denen eher latente Infektionen vorliegen.

Beim akuten Verlauf einer Salmonelleninfektion stehen Symptome wie hohes Fieber, Septikämie, Fressunlust, Atembeschwerden und übelriechender Durchfall z.T. mit Blutbeimengungen und Fibrinfetzen im Vordergrund. Nach raschem Kräfteverfall sterben die Tiere schon nach wenigen Tagen. Die subakute und chronische Verlaufsform mit Nachlassen der Munterkeit, herabgesetzter Fresslust, mäßiger Temperaturerhöhung, Durchfall und Salmonellenpneumonie kann infolge allmählicher Erschöpfung erst nach Wochen zum Tod führen oder in Genesung übergehen. Gelegentlich werden Gelenk- und Sehnenscheidenentzündungen, Abszesse und Aborte beobachtet.

Bei Pferd und Schaf rufen die tierartspezifischen Serovare *Salmonella* Abortusequi und *Salmonella* Abortusovis bei den trächtigen Muttertieren Aborte, Frühgeburten und Geburten lebensschwacher Nachkommen hervor, die nach wenigen Tagen sterben. Nach einer Fehlgeburt genesen die Muttertiere meist komplikationslos. Mitunter treten jedoch Nachgeburtshaltungen und Gebärmutterentzündungen auf, die zu Sterilität führen, wenn sie nicht ausreichend behandelt werden. Auch nicht trächtige weibliche Tiere, männliche Tiere und Kastraten ebenso wie Jungtiere jeden Alters können an der septikämischen Allgemeininfektion oft tödlich erkranken.

### 2.1.2.3 Salmonellen beim Geflügel

Die Infektion geschieht außer oral auch aerogen über erregerhaltigen Staub und kongenital durch Einwandern der Salmonellen in die Eifollikel oder durch schnelles Durchwandern der kotverschmutzten Eischale nach dem Legen. Beim Deckakt kann der Erreger mit dem Sperma übertragen werden.



In infizierten Bruteiern sterben die Embryonen häufig ab.

Krankheitssymptome bei Küken und Jungtieren sind starker Durst, Appetitlosigkeit, Mattigkeit, Wärmebedürfnis, Durchfall, Konjunktivitis, Blaufärbung des Schnabels, Gleichgewichtsstörungen, Abmagerung, Arthritiden und Septikämie. Die Tiere sterben nach wenigen Tagen. In chronischen Fällen entwickeln sich Gelenkschwellungen mit Lähmungerscheinungen.

Bei ausgewachsenen Vögeln stehen latente Infektionen im Vordergrund. Akute Verlaufsformen mit Durchfall, Fieber, Septikämie, Konjunktivitis, Futterverweigerung, Abgeschlagenheit und Durst sind selten. Häufiger tritt die chronische Form mit Nachlassen der Legeleistung, Gewichtsabnahme, Legenot und Ablegen von deformierten Eiern bei Eileiterentzündung, Peritonitis, länger anhaltende Durchfälle, Gelenkschwellungen und Gleichgewichtsstörungen auf (KÖSTERS, 1993).

### 2.1.3 Salmonellen bei Reptilien

#### 2.1.3.1 Allgemein

Salmonellen können bei allen Reptilien vorkommen. Die Salmonelleninzidenz ist bei ihnen sehr hoch; besonders häufig werden Salmonellen auch aus gesunden Tieren nachgewiesen. Es treten viele verschiedene und vor allem auch seltene Serovare auf. Eine kurze Einteilung der Reptilien ist in Abbildung 1 gegeben:

| Klasse         | Reptilia (Kriechtiere)               |
|----------------|--------------------------------------|
| • Ordnung      | Squamata (Schuppenkriechtiere)       |
| ○ Unterordnung | Sauria (Echsen)                      |
| ○ Unterordnung | Serpentes (Schlangen)                |
| • Ordnung      | Crocodylia (Krokodile)               |
| • Ordnung      | Chelonia (Schildkröten)              |
| ○ Unterordnung | Pleurodira (Halswender-Schildkröten) |
| ○ Unterordnung | Cryptodira (Halsberger-Schildkröten) |

*Abb.1: Einteilung der rezenten Reptilien nach COOPER (1997)*



Im Gegensatz zu den Reptilien kommen bei den homoiothermen Tieren in Deutschland von den über 2400 momentan bekannten Salmonellenserovaren nur 40 regelmäßig vor. Die zehn häufigsten werden jedes Jahr ermittelt; sie machen seit Jahren ca. 85 % aller Salmonellenisolate aus, allein rund 70 % entfallen auf die beiden Serovare *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Dublin (ROLLE & MAYR, 1993). Nach einer Einschätzung von KELTERBORN (1979) können nur 16 Serovare als sehr häufig eingestuft werden, das entspricht etwa 0,9 %; dabei steht *Salmonella* Typhimurium weltweit an der Spitze. Zu diesem Ergebnis kommt auch SCHRÖDER (1970 und 1990). SELBITZ et al. (1984) und SELBITZ (1986) identifizieren in Untersuchungen an Vögeln, Säugern und Reptilien im Leipziger Zoo 67 % aller Salmonellenisolate als *Salmonella* Typhimurium; bei Vögeln macht dieses Serovar 84 % und bei Säugern 65 % aus, bei Reptilien dagegen nur 28 %. ELZE et al. (1977) geben ebenfalls für Reptilien im Leipziger Zoologischen Garten für dieses Serovar 22 % an, und bei SCHRÖDER (1990) beträgt sein Anteil bei Reptilien sogar nur 2 %. IVESON et al. (1969) und FRICK (1987) betonen das Nichtvorhandensein von *Salmonella* Typhimurium bei wilden Reptilien aus entlegenen Gegenden. Nach KÜHN (1995) hat seit einigen Jahren *Salmonella* Enteritidis weltweit bei allem Untersuchungsmaterial die Spitzenposition eingenommen. Bei Reptilien nimmt nun aber nicht etwa ein anderes Serovar den Rang 1 der Häufigkeit ein, vielmehr ist ein außerordentlich breites Spektrum charakteristisch für diese Tierklasse (SCHRÖDER, 1970; SELBITZ & ENGELMANN, 1984; SELBITZ et al., 1984; SELBITZ, 1986; SCHRÖDER, 1990).

Es wird darauf verzichtet, alle bisher aus Reptilien isolierten Salmonellenserovare aufzuzählen, da es den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. So eine Aufstellung könnte auch niemals vollständig sein, weil immer wieder neue Serovare entdeckt werden (BOYCOTT et al., 1953; KAMPELMACHER et al., 1962; LIE, 1968; SCHRÖDER, 1970; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; SCHRÖDER, 1990). Absichtlich werden auch nicht einige evtl. doch häufigere oder für Reptilien typische Serovare genannt, damit der Leser denen nicht eine besondere Bedeutung zumisst, z.B. bezüglich der Pathogenität, der Verbreitung oder der Übertragbarkeit. Außerdem werden in der z.T. schon älteren verwendeten Literatur auch Serovare aus anderen Subspezies als Subspezies I mit den damals noch üblichen Serovarnamen genannt, während die gleichen Serovare in neuerer Literatur nur noch mit der Antigenformel bezeichnet werden. Man könnte sich daher wundern, warum frü-



her evtl. häufiger vorkommende Serovare in jüngerer Zeit nicht mehr auftauchen. Sicher treten manche Serovare häufiger auf als andere, aber dies variiert innerhalb enger Regionen eines Landes ebenso sehr wie bei verschiedenen Tierarten innerhalb einer Gattung (DIMOW, 1966a; WUTHE et al, 1979; FRICK, 1987).

Vielmehr soll die große Variabilität der Salmonellen bei Reptilien dargestellt und das häufige Auftreten sogenannter seltener oder exotischer Serovare veranschaulicht werden, des weiteren die hohe Inzidenz der Salmonellen allgemein in dieser Tierklasse betont und die Bedeutung ihrer Anwesenheit aufgezeigt werden.

Als „seltene Salmonellen“ werden diejenigen Salmonellen bezeichnet, die neben den Erregern spezifischer Menschen- und Tiersalmonellosen und den nicht wirtsspezifischen, bodenständigen Typen vereinzelt nachgewiesen werden (LANG, 1961).

### **2.1.3.2 Salmonellennachweise bei Reptilien**

Die frühesten Berichte über Salmonellen bei Reptilien erscheinen Mitte des 20. Jahrhunderts in den USA und sind eigentlich Zufallsbefunde. CALDWELL & RYERSON (1939) isolieren das ersten Mal Arizonakeime aus Echsen. „Echte“ Salmonellen werden zum ersten Mal von HINSHAW & MCNEIL (1944) bei Schlangen und von MCNEIL & HINSHAW (1946) bei Schildkröten und Echsen nachgewiesen. In England berichten zum ersten Mal BOYCOTT et al. (1953) über Salmonellen bei Maurischen Landschildkröten, *Testudo graeca*; diese Autoren stellen auch schon gezielte Nachforschungen an und entdecken, dass bei einigen Tieren mehrere verschiedene Serovare gleichzeitig vorkommen. Auch die Dauerausscheidung bzw. lang anhaltende Ausscheidung von Salmonellen bei Schildkröten fällt ihnen auf: Bei zwei von ihnen mehrmals untersuchten Tiere können sie die gleichen Serovare über mindestens drei Monate immer wieder nachweisen. Später werden Dauerausscheidung und Doppel- und Mehrfachinfektionen bei allen Reptilien von anderen Autoren bestätigt (BÖVRE & SANDBU, 1959; GEBAUER, 1954; WILLIAMS et al., 1965; DIMOW, 1965a und b, 1966b; LIE, 1968; IVESON et al., 1969; SCHRÖDER, 1970; KOOPMAN & JANSSEN, 1973; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; CAMBRE et al., 1980; SCHRÖDER, 1990). ANG et al. (1973) beispielsweise können bei mehreren Schildkröten sogar Vierfachinfektionen, d.h. Infektionen mit vier verschiedenen Serovaren, feststellen.



Seitdem wurden auch zahlreiche gezielte Untersuchungen auf Salmonellen bei Reptilien angestellt, mittlerweile existieren sehr viele Berichte über Salmonellennachweise bei Schildkröten, Echsen und Schlangen aus fast allen Ländern, z.B. Schweiz (RUDAT et al., 1966), Niederlande (KAMPELMACHER et al., 1962; KOOPMAN & JANSSEN, 1973; DORRESTEIN et al., 2000), Norwegen (BÖVRE & SANDBU, 1959), Bulgarien (DIMOW et al., 1961), Türkei (ANG et al., 1973; FRICK, 1987), Israel (GREENBERG & SECHTER, 1992), Südamerika (KALVIG et al., 1991), Australien (IVESON et al., 1969; IVESON, 1971) und Neuseeland (DE HAMEL et al., 1971), um nur einige zu nennen. Naturgemäß stammen vor allem in den nördlicheren Ländern die untersuchten Reptilien meistens aus Gefangenschaftshaltung, in wärmeren Gegenden werden auch vermehrt Studien an freilebenden Tieren durchgeführt.

Aus den USA liegen hauptsächlich Untersuchungen über die Isolierung von Salmonellen aus Wasserschildkröten aus Aquarienhaltung vor (WILLIAMS & HELSDON, 1965; KAUFMANN, 1966; KAUFMANN & MORRISON, 1966; KAUFMANN et al., 1972; OTIS & BEHLER, 1973; SIEBELING et al., 1984); Ursache dafür ist die Tatsache, dass junge Wasserschildkröten früher beliebte Heimtiere in den USA darstellten, während Landschildkröten eher selten gehalten wurden (WILLIAMS & HELSDON, 1965). Am häufigsten war die Rotwangenschmuckschildkröte, *Trachemys scripta elegans*, ehemals als *Pseudemys scripta elegans* bezeichnet; sie wurde vor allem kleinen Kindern oft als Spielzeug geschenkt. Doch auch andere Schildkrötenarten waren üblich (WILLIAMS & HELSDON, 1965; KAUFMANN & MORRISON, 1966). Nach Angaben von LAMM et al. (1972) wurden jährlich ca. 15 Millionen Schildkröten in den USA verkauft, die meisten davon starben schon nach zwei Monaten (LAMM et al., 1972; ANONYMUS, 1975). Sie stammten entweder aus Zuchtfarmen in Arkansas, Florida, Louisiana und Mississippi, oder es wurden freilebende Tiere in Südamerika gefangen und importiert (WILLIAMS & HELSDON, 1965). Aber auch aus Landschildkröten, Schlangen und Echsen sind Salmonellennachweise bekannt (JACKSON & JACKSON, 1971; CAMBRE et al., 1980; KALVIG et al., 1991; WEIL et al., 1995; MERMIN et al., 1997).

In Kanada wurden Salmonellen ebenfalls oft aus Rotwangenschmuckschildkröten isoliert, die von Zuchtfarmen in den USA importiert wurden (D'AOUST et al., 1990); WOODWARD et al. (1997) berichten über Salmonellen bei Schildkröten, Echsen und Schlangen.



In Deutschland beruhen die meisten Berichte über Salmonellen bei Reptilien auf Untersuchungen von Tierbeständen in zoologischen Gärten, zum Teil auch aus Zoohandlungen und vereinzelt aus Privathaltungen. Studien an freilebenden, wilden Reptilien gibt es nur wenige. Dementsprechend ist das Untersuchungsgut recht vielfältig, da Zoos oft über eine buntgemischte Reptiliensammlung verfügen. So werden Salmonellen aus Reptilien aus dem Frankfurter Zoologischen Garten (LIE, 1968), dem Berliner Aquarium (HABERMALZ & PIETZSCH, 1973), dem Kölner Zoo, dem Tierpark Hellabrunn (ROGGENDORF & MÜLLER, 1976) und dem Leipziger Zoologischen Garten (ELZE et al., 1977; SELBITZ et al., 1984) isoliert. KIESEWALTER et al. (1960) weisen sie bei Schildkröten aus Zoohandlungen in Berlin und Rostock nach, WEBER & PIETZSCH (1974) bei Schildkröten aus Zoohandlungen und Privathaltungen im Raum Gießen. Schließlich findet sich ein Beitrag über das Vorkommen von Salmonellen bei freilebenden Schlangen in Norddeutschland: WUTHE et al. (1979) berichten von Kreuzottern, *Vipera berus* L., und Ringelnattern, *Natrix natrix* L., aus Schleswig-Holstein und dem nördlichen Niedersachsen, die Salmonellen beherbergen.

### 2.1.3.3 Das breite Keimspektrum der Salmonellen bei Reptilien

Bei all diesen Untersuchungen beeindruckt das breite Keimspektrum, das bei Reptilien vorliegt, und das gehäufte Vorkommen von ungewöhnlichen Serovaren. Bereits im Jahr 1953 weisen BOYCOTT et al. darauf hin, dass es nicht die üblichen Salmonellen sind, die sie bei ihrer Untersuchung aus Maurischen Landschildkröten nachgewiesen haben, und dass eine auffallend große Variabilität der Serovare besteht. Ebenfalls einen seltenen Salmonellentyp isoliert auch GEBAUER (1954) aus einer Maurischen Landschildkröte. KIESEWALTER et al. (1960), RUDAT et al. (1966) und IVESON et al. (1969) beschreiben bei Reptilien viele verschiedene Salmonellentypen, die hauptsächlich zu den selteneren hohen Serogruppen gehören. SCHRÖDER (1970 und 1990) betont die außerordentliche Vielfalt und den häufigen Nachweis ungewöhnlicher und seltener Salmonellentypen und Subspezies III-Salmonellen. Auch GEUE & LÖSCHNER (2002) finden eine große Typenvielfalt und mit 40 % viele seltene oder exotische Serovare bei dieser Tierklasse; bei ihnen sind alle Serovare aus *Salmonella enterica*, v.a. aus Subspezies I (45 von 103 Isolaten) und IIIb, aber auch aus II, IIIa und IV. Die Verteilung der Salmonellen auf die einzelnen Subspezies ist bei DORRESTEIN et al. (2000) ähnlich: Von 1156 im Zeitraum von 1971-1998 aus Reptilien isolierten Salmonellen-



stämmen gehören 37 % zu I, 10 % zu II, 37 % zu III und 11 % zu IV; 6 % sind unbekannt und lassen sich nicht zuordnen. LIE (1968), HABERMALZ & PIETZSCH (1973) und MAYER & FRANK (1974) finden bei allen Reptiliengruppen Serovare aus allen vier damals bekannten Subspezies, wobei Subspezies I am häufigsten vorkommt, an zweiter Stelle Subspezies III, dann II und am seltensten IV. Die genaue Verteilung bei HABERMALZ & PIETZSCH (1973) ist: 68 % Subspezies I, 12 % Subspezies II, 18 % III und 1 % IV.

Ein recht bezeichnendes Beispiel für die große Variabilität, aber auch für die hohe Inzidenz der Salmonellen bei Reptilien stellt das Ergebnis der Untersuchung von BOYCOTT et al. (1953) dar: Aus 13 Maurischen Landschildkröten isolieren sie 18 verschiedene Serovare, darunter auch sieben neue. Eines davon wird später als *Salmonella* Sofia identifiziert; *Salmonella* Sofia gehört in die Subspezies II und ist antigenetisch identisch mit *Salmonella* Paratyphi B (LIE, 1968). *Salmonella* Paratyphi B selbst wurde auch schon mehrfach bei Reptilien nachgewiesen (DIMOW et al., 1961; DIMOW, 1966a; KAUFMANN, 1966; JEPHCOTT et al., 1969; SCHRÖDER, 1970; BAKER et al., 1972; ELZE et al., 1977).

Ein ebenfalls sehr eindrucksvolles Beispiel ist bei DORRESTEIN et al. (2000) gegeben: Sie finden 1156 Salmonellenstämmen, diese gehören zu 524 Serovaren; nur 14 werden über 10 mal isoliert, 338 Serovare treten nur einmal auf. Die bei Menschen üblichen Serovare *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis kommen 27 bzw. 8 mal vor.

Die Untersuchung von BÖVRE & SANDBU (1959) bestätigt die große Vielfalt der Salmonellen bei Schildkröten: Sie finden unter 30 Isolaten 19 verschiedene Serovare. Bei RUDAT et al. (1966) gehören 35 Isolate aus Reptilien 15 unterschiedlichen Serovaren an, von denen 14 in seltene Serogruppen einzuordnen sind. LIE (1968) kann 52 verschiedene Serovare bei 124 Isolaten unterscheiden, HABERMALZ & PIETZSCH (1973) 72 bei 163, MAYER & FRANK (1974) 43 bei 56 und ROGGENDORF & MÜLLER (1976) 21 Serovare bei 54 Isolaten; ELZE et al. (1977) finden bei 27 salmonellenpositiven Reptilien im Leipziger Zoologischen Garten 15 verschiedene Salmonellentypen.

Weiterhin tauchen bei KALVIG et al. (1991) exotische Serovare auf, die mit den üblicherweise getesteten polyvalenten Antiseren für die O-Gruppen A-E und F-I nicht erfasst werden können und deshalb weiter hinten stehenden Serogruppen zugeordnet werden müssen; bei KOOPMAN & JANSSEN (1973) sind von 95 Isolaten 21 in den Niederlanden bisher noch nie beschrieben.



Sehr häufig werden Salmonellen isoliert, die in dem jeweiligen Land sehr selten oder noch nie nachgewiesen wurden, und immer wieder werden auch neue Serovaren entdeckt (KAMPELMACHER et al., 1962; BREDE, 1963; ANG et al., 1973; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; MAYER & FRANK, 1974; MAYER & FRANK, 1977; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; WUTHE et al., 1979; SCHRÖDER, 1990; GREENBERG & SECHTER, 1992).

Eine Verbindung zwischen bestimmten Reptilienspezies und Salmonellenserovaren sehen GEUE & LÖSCHNER (2002) nicht; ebenso können IVESON et al. (1969) keinen Unterschied bei Salmonellen von wilden oder gefangenen Reptilien erkennen, außer dass *Salmonella* Typhimurium bei wilden Tieren aus abgelegenen Regionen nicht vorkommt, weder bei Reptilien noch bei Vögeln oder Säugern.

Zahlreiche andere Untersuchungen demonstrieren weiterhin die große Variabilität der Salmonellen bei Reptilien und den hohen Anteil seltener Serovaren; aus den aufgeführten Beispielen wird aber schon deutlich, wie vielfältig das Keimspektrum der Salmonellen bei dieser Tierklasse ist, wie häufig ungewöhnliche Serovaren auftreten, und dass außer Subspezies I auch oft Salmonellen aus den Subspezies II, IIIa und IIIb und IV vorkommen.

#### **2.1.3.4 Häufigkeit der Salmonellen bei Reptilien allgemein**

Alle Autoren sind sich über die hohe Salmonelleninzidenz bei Reptilien einig und betonen den häufigen Salmonellennachweis. So sprechen SELBITZ & ENGELMANN (1984) von „erschreckend hohen Befallsraten auch bei klinisch gesunden Reptilien“, bei BOYCOTT et al. (1953) ist der „Anteil der Salmonellen bei Maurischen Landschildkröten auffällig“, RUDAT et al. (1966) unterstreichen die „Vielzahl der Salmonellenfunde“, bei KOOPMAN & JANSSEN (1973) enthalten 94 % der Proben von gesunden Reptilien Salmonellen, und WOODWARD et al. (1997) schätzen, dass 90 % aller Reptilien Salmonellenträger sind; DIMOW (1966a) findet bei freilebenden Landschildkröten in Bulgarien 100 % Salmonellenausscheider.

In den folgenden Tabellen sind die Nachweisraten einiger Autoren von Salmonellen bei Reptilien allgemein und bei Schildkröten, Echsen, Schlangen und Krokodilen im Einzelnen dargestellt.



Die Literaturangaben über die Nachweishäufigkeit der Salmonellen schwanken zum Teil beträchtlich. Sie reichen von 100 % bei DIMOW (1966a) bis hin zu nur 3 % bei CAMBRE et al. (1980). Für diese Differenzen gibt es mehrere Gründe: Da ist zunächst einmal das Probenmaterial selbst, dann die Art und Weise der Probennahme, die Anzucht der Salmonellen und schließlich die weitere Untersuchung der Kulturen.

So werden beispielsweise bei manchen Studien Kotproben genommen (PRUKSARAJ, 1967; ANG et al., 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976), meist von Einzeltieren, teils jedoch auch Sammelproben (GEUE & LÖSCHNER, 2002), manchmal Kloakentupfer (KIESEWALTER et al., 1960; IVESON et al., 1969; IVESON, 1971; JACKSON & JACKSON, 1971; OTIS & BEHLER, 1973), manchmal auch beides (BÖVRE & SANDBU, 1959; WEBER & PIETZSCH, 1974); in anderen Fällen stammt das Untersuchungsgut aus Sektionen (SCHRÖDER, 1970; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; ELZE et al., 1977; CAMBRE et al., 1980; ONDERKA & FINLAYSON, 1985; GÖBEL & SCHILDGER, 1990; SCHRÖDER, 1990; DORRESTEIN et al., 2000).

Auch macht es einen Unterschied, ob die Proben nur von äußerlich gesund erscheinenden (WILLIAMS et HELSDON, 1965; KOOPMAN & JANSSEN, 1973; OTIS & BEHLER, 1973; DORRESTEIN et al., 2000; IVESON, 1971; JACKSON & JACKSON, 1971) oder klinisch kranken Tieren (GÖBEL & SCHILDGER, 1990) oder wiederum von beiden herrühren (ELZE et al., 1977), ob die Probennahme und -untersuchung einmalig (BÖVRE & SANDBU, 1959; DIMOW et al., 1961; DIMOW & RHODE, 1965; WEBER & PIETZSCH, 1974) oder mehrfach (DIMOW, 1966a; PRUKSARAJ, 1967; ANG et al. 1973) durchgeführt wird, und wie schnell das Material weiterverarbeitet wird. Zum Beispiel ließen GEUE & LÖSCHNER (2002) sich ihre Proben mit der normalen Post schicken und hatten eventuell aufgrund von Austrocknung während des langen Transportes einen gewissen Anteil an sterilen Kotproben, aus denen sie keinerlei Keime anzüchten konnten; dies war bei 30 von 189 Proben der Fall. JACKSON & JACKSON (1971) vermuten, dass ihre Ergebnisse höher ausgefallen wären, wenn sie statt des mobilen ein permanentes Labor zur Verfügung gehabt hätten.

Bei der Untersuchungsmethode selbst spielt es eine große Rolle, ob eine Selektivanreicherung durchgeführt wird (KIESEWALTER et al., 1960; PRUKSARAJ, 1967; IVESON, 1971; WEBER & PIETZSCH, 1974; SELBITZ et al., 1984; FRICK, 1987; SCHRÖDER, 1990) oder nicht (OTIS & BEHLER, 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976), auf welchen



Nährböden ausgestrichen wird, welche Kolonien als verdächtig gelten und wie viele davon weiteruntersucht werden. GEUE & LÖSCHNER (2002) führen z.B. eine Zweifachanreicherung, WUTHE et al. (1979) sogar eine Dreifachanreicherung durch. KOOPMAN & JANSSEN (1973) verwenden drei, IVESON et al. (1969) fünf verschiedene Anreicherungsmedien. In manchen Studien werden durch die Untersuchungsmethode nur laktosenegative Salmonellen erfasst (SCHRÖDER, 1970; KOOPMAN & JANSSEN, 1973; WEBER & PIETZSCH, 1974; SELBITZ et al., 1984; SCHRÖDER, 1990), wodurch Laktose prompt oder verzögert spaltende, sogenannte laktosepositive Salmonellen übersehen werden. Andere Autoren untersuchen laktoseunabhängig (WUTHE et al., 1979; FRICK, 1987), und bei ROGGENDORF & MÜLLER (1976) werden alle Kolonien weiterdifferenziert.

Auch die Anzahl der weiteruntersuchten und enddifferenzierten Kolonien entscheidet über die Nachweishäufigkeit von Salmonellen und vor allem über das Auffinden von mehreren Serovaren in einer Probe. So werden von verschiedenen Autoren zwischen drei und 50, manchmal sogar noch mehr verdächtige Kolonien oder alle gut isolierten Einzelkolonien weiteruntersucht (BOYCOTT et al., 1953; IVESON, 1971; FRICK, 1987; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; GEUE & LÖSCHNER, 2002) und auf diese Weise selbst Vierfachinfektionen festgestellt (DIMOW et al., 1961; ANG et al., 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; DORRESTEIN et al., 2000).

Schließlich berücksichtigen manche Autoren in ihren Angaben über Salmonellenisolate auch Arizonakeime (JACKSON & JACKSON, 1971), also Subspezies III-Salmonellen, manche schließen sie aus oder erwähnen sie zusätzlich (KIESEWALTER et al., 1960; ANG et al., 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976).

HABERMALZ & PIETZSCH (1973) schätzen den Anteil der Salmonellenisolate in ihrer Studie als zu niedrig ein, da auch Amphibien mituntersucht wurden, die relativ selten Salmonellen beherbergen.

Vergleiche der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind daher nur bedingt möglich und dürfen nur unter Berücksichtigung der vielfältigen Einflussfaktoren vorgenommen werden. In Tabelle 1 sind Nachweisraten von Salmonellen bei Reptilien allgemein zusammengestellt:

**Tab. 1:** Häufigkeit von Salmonellen bei verschiedenen Reptilien ohne Angabe bestimmter Tierarten

| Herkunft  | n    | % pos.                     | Probenart                              | Untersuchung   | Autor                         |
|---|------|----------------------------|--|--|-------------------------------|
| Niederlande;<br>importierte +<br>ein heimisches | 169  | 94                         | Kot                                    | einmal; erfasst nur<br>laktosenegative<br>Kolonien   | KOOPMAN &<br>JANSSEN, 1973    |
| Berliner Aqua-<br>rium                          | 167  | 61                         | Kot, Bassinwasser,<br>einige Amphibien | <sup>a</sup> vermutlich einmal;<br>laktoseunabhängig<br>mehrere verschiede-<br>ne Einzelkolonien | HABERMALZ &<br>PIETZSCH, 1973 |
| Deutschland +<br>Österreich;<br>Züchter + ZH    | 159  | 54                         | Kot                                    | einmal; Voranrei-<br>cherung + Zwei-<br>fachenreicherung   | GEUE &<br>LÖSCHNER, 2002      |
| Frankfurter Zoo                                 | 194  | 50                         | Kot                                    | mehrfach   | LIE, 1968                     |
| Schweiz; Zoos                                   | 191  | Be: 42<br>Ba: 30<br>Zü: 26 | Kloakentupfer                          | einmal   | RUDAT et al., 1966            |
| USA; Zoo  | 317  | 37                         | Kloakentupfer +<br>Organe              | z.T. mehrfach  | CAMBRE et al.,<br>1980        |
| Deutschland;<br>privat, Zoos,<br>ZH             | 2067 | 32                         | Organe                                 | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | SCHRÖDER, 1970                |
| Niederlande;<br>Zoos, ZH +<br>privat            | 1096 | 31                         | Organe, Kot u.a.;<br>gesunde + kranke  | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | DORRESTEIN et<br>al., 2000    |
|   | 806  | 26                         | Organe                                 |  |                               |
|   | 181  | 17                         | gesunde                                |  |                               |
| Kölner Zoo,<br>Tierpark Hel-<br>labrunn, privat | 78   | 29 S<br>+<br>5 A           | Kot                                    | <sup>a</sup> vermutlich einmal;<br>keine Anreicherung;<br>jede gut isolierte<br>Einzelkolonie    | ROGGENDORF &<br>MÜLLER, 1976  |
| Deutschland;<br>privat, Zoos,<br>ZH             | 5000 | 29                         | Organe                                 | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | SCHRÖDER, 1990                |
|   | 4000 | 27                         | Organe                                 | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | IPPEN &<br>SCHRÖDER, 1977     |
| Deutschland;<br>Zoos + privat                   | 146  | 20                         | Organe                                 | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | GÖBEL &<br>SCHILDGER, 1990    |
|   | 152  | 10                         | kranke                                 |  |                               |
| Zoologischer<br>Garten Leipzig                  | 326  | 12                         | Organe + Kot; ge-<br>sunde + kranke    | k.A.   | SELBITZ et al.,<br>1984       |
|   | 347  | 11                         |  |  | SELBITZ, 1986                 |
| Zoologischer<br>Garten Leipzig                  | 215  | 8                          | gesunde, kranke +<br>Organe            | <sup>a</sup> vermutlich einmal   | ELZE et al., 1977             |

**Abkürzungen:** A: Arizonakeime; Ba: Basel, Be: Bern; k.A.: keine Angaben; n: Anzahl der untersuchten Tiere; S: Salmonellen; ZH: Zoohandlungen; Zü: Zürich; % pos.: Anteil der salmonellenpositiven Tiere; <sup>a</sup>: keine eindeutigen Angaben in der Literatur

### 2.1.3.5 Salmonellen bei Schildkröten

Die Häufigkeit des Salmonellennachweises bei Landschildkröten liegt bei bis zu 100 %, Mehrfachinfektionen kommen bei bis zu 60 % vor, Arizonakeime können bei 12 % nachge-



wiesen werden. Dies ist das Ergebnis einer mehrmaligen Untersuchung freilebender Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni* in Bulgarien (DIMOW, 1966a). Bei einer vorangegangenen Studie kommt der gleiche Autor nur auf 56 %, allerdings ohne Arizonakeime, schätzt diese Zahl aber als zu niedrig ein, da von jedem Tier nur eine Kotprobe untersucht und nur eine geringe Anzahl verdächtiger Kolonien weiterdifferenziert wurde (DIMOW et al., 1961). Über eine ebenfalls recht hohe Salmonelleninzidenz berichten BÖVRE & SANDBU (1959) bei aus dem Mittelmeerraum nach Norwegen importierten Landschildkröten mit 81 % und ANG et al. (1973) bei freilebenden Schildkröten in Istanbul mit 77 %; von einer häufigen Kontamination bei Wasserschildkröten sprechen WILLIAMS & HELSDON (1965).

Bei anderen Autoren finden sich zum Teil wesentlich niedrigere Angaben. So bestätigen JACKSON & JACKSON (1971) und CAMBRE et al. (1980) Schildkröten mit 12 % bzw. 3 % eine nur mäßig hohe bzw. niedrige Salmonelleninzidenz. Auch bei GEUE & LÖSCHNER (2002) ist der Anteil der Salmonellenausscheider unter den Schildkröten deutlich niedriger als unter den Echsen und Schlangen. Nur eine einzige von 24 ist salmonellenpositiv; bei dieser kann jedoch eine Doppelinfection nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass der Sammelzeitraum in den Monaten November und Dezember, in denen sich die meisten Schildkröten auf den Winterschlaf vorbereiten und ihre Aktivität herabgesetzt ist, die Ursache für die niedrige Nachweisrate von Salmonellen bei Schildkröten in ihrer Studie ist.

IVESON et al. (1969), CAMBRE et al. (1980) und GREENBERG & SECHTER (1992) können bei Schildkröten keine Arizonakeime nachweisen, WEBER & PIETZSCH (1974) können dies aufgrund ihrer Untersuchungsmethode nicht; sie erfassen nur laktosenegative Salmonellen, prompt Laktose spaltende Stämme entgehen ihnen. So gehören von ihren 28 verschiedenen Serovaren 22 zur Subspezies I, fünf zu II und eine zu IV. DORRESTEIN et al. (2000) finden bei dieser Tiergruppe ebenfalls am häufigsten Salmonellen aus Subspezies I, dann aus II und III, eher selten dagegen aus IV. Nach ihren Ergebnissen tritt die Subspezies II von allen Reptiliengruppen bei Schildkröten am häufigsten auf.

Eine genauere Aufstellung der Nachweishäufigkeit von Salmonellen bei Schildkröten ist Tabelle 2 zu entnehmen; dabei ist zu beachten, dass nur selten konkrete Informationen über die untersuchte Tierart vorlagen. Oft ist nicht einmal klar, ob es sich um Landschildkröten oder um Wasserschildkröten handelt. Wenn Angaben gemacht wurden, so sind diese in Tabelle 2 wiedergegeben:



Tab. 2: Häufigkeit von Salmonellen bei Schildkröten

| Herkunft der SK                      | n        | % pos.  | Probenart                        | isolierte Bakterien                                    | Untersuchung                 | Autor                                 |
|--------------------------------------|----------|---------|----------------------------------|--|------------------------------|---------------------------------------|
| Australien                           | 4        | 100     | KT + Org.                        | keine A bei SK   | einmal                       | IVESON et al., 1969                   |
| Bulgarien; wild                      | 493      | bis 100 | Kot                              | zusätzlich A   | mehrfach                     | DIMOW, 1966a <sup>1</sup>             |
| Norwegen; PH + ZH                    | 33       | 81      | KT + Kot                         | k. A. über A   | einmal                       | BÖVRE & SANDBU, 1959 <sup>2</sup>     |
| Istanbul; wild                       | 31       | 77      | Kot                              | S + A  | mehrfach                     | ANG et al., 1972                      |
| 3 verschiedene ZH in Hannover        | ges. 107 | 62      | Kot + Org.                       | erfasst durch Untersuchungsmethode nur laktosenegative | mehrfach                     | PRUKSARAJ, 1967 <sup>1</sup>          |
|                                      | ZH2: 49  | 79      |                                  |  |                              |                                       |
|                                      | ZH1: 39  | 51      |                                  |  |                              |                                       |
|                                      | ZH3: 19  | 42      |                                  |  |                              |                                       |
| Bulgarien; wild                      | 198      | 56      | KT + Kot                         | zusätzlich A   | einmal                       | DIMOW et al., 1961 <sup>1</sup>       |
| USA; ZH                              | 56       | 48      | Bassinwasser                     | S + A  | einmal                       | BAKER et al., 1972 <sup>4</sup>       |
|                                      | 28       | 46      |                                  |  |                              |                                       |
| PH + ZH in Gießen                    | ZH 74    | 47      | KT + Kot                         | erfasst nur laktosenegative                            | einmal                       | WEBER & PIETZSCH, 1974                |
|                                      | PH 51    | 41      |                                  |  |                              |                                       |
| ZH in Berlin + Rostock               | 528      | 36      | KT                               | k.A. über A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | KIESEWALTER et al., 1960 <sup>3</sup> |
| Zoolog. Garten New York              | 127      | 32      | KT von gesunden                  | keine A bei SK   | <sup>a</sup> vermutl. einmal | OTIS & BEHLER, 1973                   |
| USA; PH, ZH, Schulen                 | 38       | 55      | Organe                           | zusätzlich häufig A                                    | einmal                       | WILLIAMS & HELSDON, 1965 <sup>4</sup> |
|                                      |          | 31      | KT                               |  |                              |                                       |
| Frankfurter Zoo                      | 26       | 30      | Kot                              | S + A  | z.T. mehrfach                | LIE, 1968                             |
| Deutschland; PH, ZH, Zoos            | k. A.    | 20      | Org.                             | k.A.   | <sup>a</sup> vermutl. einmal | SCHRÖDER, 1990                        |
| Deutschland; PH, ZH, Zoos            | 485      | 18      | Org.                             | k.A.   | <sup>a</sup> vermutl. einmal | IPPEN & SCHRÖDER, 1977                |
| Deutschland; PH, ZH, Zoos            | 529      | 15      | Org.                             | <sup>a</sup> erfasst vermutl. nur laktoseneg.          | <sup>a</sup> vermutl. einmal | SCHRÖDER, 1970                        |
| England; ZH                          | 39       | 14      | Bassinwasser + Org.              | erfasst nur laktosenegative                            | mehrfach                     | JEPHCOTT, 1969 <sup>4</sup>           |
| USA; Zoos                            | 124      | 12      | KT von gesunden                  | S + A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | JACKSON & JACKSON, 1971               |
| Deutschland; PH + Zoos               | 56       | 14      | krank                            | k.A. über A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | GÖBEL & SCHILDGER, 1990               |
|                                      | 20       | 10      | Org.                             |  |                              |                                       |
| Niederlande; PH, ZH, Zoos            | 283      | 10      | Kot, Org. u.a.; gesunde + kranke | S + A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | DORRESTEIN et al., 2000               |
|                                      | 220      | 5       | Organe                           |  |                              |                                       |
|                                      | 42       | 2       | gesunde                          |  |                              |                                       |
| Zoologischer Garten Leipzig          | 38       | 9       | krank, gesunde, Org.             | k.A. über A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | ELZE et al., 1977                     |
| Kanada; PH + ZH                      | 14       | 7       | Org.                             | S + A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | ONDERKA & FINLAYSON, 1985             |
| PH, Kölner Zoo + Tierpark Hellabrunn | 15       | 7       | Kot                              | S + A  | <sup>a</sup> vermutl. einmal | ROGGENDORF & MÜLLER, 1976             |

**Fortsetzung Tab. 2: Häufigkeit von Salmonellen bei Schildkröten**

| Herkunft der SK                        | n  | % pos. | Probenart | isolierte Bakterien | Untersuchung  | Autor                   |
|--|----|--------|-----------|---------------------|---------------|-------------------------|
| Österreich + Deutschland; Züchter + ZH | 28 | 3      | Kot       | S + A               | einmal        | GEUE & LÖSCHNER, 2002   |
| USA; Zoo                               | 63 | 3      | KT + Org. | keine A bei SK      | z.T. mehrfach | CAMBRE et al., 1980     |
| Süddeutschland; PH                     | 61 | 3      | Kot       | S                   | einmal        | MÖRK, 1997 <sup>5</sup> |
|  | 63 | 1,5    | RT        |                     |               |                         |

**Abkürzungen:** A: Arizonakeime; ges.: gesamt; k.A.: keine Angaben; KT: Kloakentupfer; n: Anzahl untersuchter Tiere; Org.: Organe; PH.: Privathaltung; RT: Rachentupfer; S: Salmonellen; WSK: Wasserschildkröten; ZH: Zoohandlung; SK: Schildkröten; % pos.: Anteil der salmonellenpositiven Tiere; <sup>a</sup>: keine eindeutigen Angaben in der Literatur; <sup>1</sup>: T. graeca und T. hermanni; <sup>2</sup>: „Tortoises“ aus dem Mittelmeerraum; <sup>3</sup>: T. hermanni aus Albanien; <sup>4</sup>: gesunde, junge Wasserschildkröten, Trachemys scripta elegans; <sup>5</sup>: T. graeca, T. hermanni, T. marginata und Agrionemys horsfieldii

### 2.1.3.6 Salmonellen bei Echsen

Die Häufigkeit von Salmonellennachweisen bei Echsen ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

CAMBRE et al. (1980) schreiben Echsen eine mittlere Salmonelleninzidenz von 36 % zu. DORRESTEIN et al. (2000) und GEUE & LÖSCHNER (2002) bestätigen Echsen dagegen eine hohe Inzidenz. Auch IVESON et al. (1969) und ROGGENDORF & MÜLLER (1976) finden Salmonellen am häufigsten bei Echsen, während Arizonakeime bei Schlangen häufiger vorkommen als bei Echsen.

Besondere Erwähnung verdient die Untersuchung von MITCHELL et al. (2000), die 94 % der Grünen Leguane, *Iguana iguana*, als Salmonellenausscheider enttarnt. Diese Beobachtung ist umso bedeutungsvoller, als sich diese Tiere zunehmender Beliebtheit erfreuen.

Die Subspezies I-VI kommen bei Echsen relativ gleichmäßig vor, evtl. tritt I etwas häufiger auf. Der Anteil der Subspezies I beträgt bei allen Reptilien um 30-50 %. Subspezies IV wird insgesamt eher selten nachgewiesen, am häufigsten noch bei Echsen (DORRESTEIN et al., 2000).

### 2.1.3.7 Salmonellen bei Schlangen

Nach MAYER & FRANK (1974) und ELZE et al. (1977) ist die Durchseuchung mit Salmonellen bei Schlangen – besonders bei Riesenschlangen – am höchsten. Auch CAMBRE et al. (1980) gestehen Schlangen mit 55 % die höchste Salmonelleninzidenz zu.



Tab. 3: Häufigkeit von Salmonellen bei Echsen

| Herkunft der Echsen                    | n     | % pos. | Probenart                          | isolierte Bakterien                        | Untersuchung                   | Autor                              |
|--|-------|--------|------------------------------------|--|--------------------------------|------------------------------------|
| El Salvador; 2 Zuchtfarmen             | 120   | 94     | KT                                 | S  | einmal                         | MITCHELL et al., 2000 <sup>1</sup> |
|  | 120   | 67     |                                    |  |                                |                                    |
| Australien                             | 70    | 77     | KT + Organe                        | S + A                                      | meist einmal                   | IVESON et al., 1969                |
| Deutschland + Österreich; Züchter + ZH | 59    | 61     | Kot                                | S + A                                      | einmal                         | GEUE & LÖSCHNER, 2002              |
| Frankfurter Zoo                        | 90    | 52     | Kot                                | S + A                                      | z.T. mehrfach                  | LIE, 1968                          |
| PH, Kölner Zoo + Tierpark Hellabrunn   | 36    | 50     | Kot                                | zusätzlich A                               | <sup>a</sup> vermutlich einmal | ROGGENDORF & MÜLLER, 1976          |
| Niederlande; PH, ZH, Zoos              | 399   | 41     | Organe, Kot u.a.; gesunde + kranke | S + A                                      | <sup>a</sup> vermutlich einmal | DORRESTEIN et al., 2000            |
|  | 311   | 33     | Organe                             |  |                                |                                    |
|  | 33    | 6      | gesunde                            |  |                                |                                    |
| USA; Zoo                               | 129   | 39     | KT + Organe                        | S + A                                      | z.T. mehrfach                  | CAMBRE et al., 1980                |
| Deutschland; PH, ZH, Zoos              | 845   | 38     | Organe                             | <sup>a</sup> vermutl. nur laktose-negative | <sup>a</sup> vermutlich einmal | SCHRÖDER, 1970                     |
|  | k. A. | 35     |                                    | k.A.                                       |                                | SCHRÖDER, 1990                     |
| Deutschland; PH, ZH, Zoos              | 1578  | 31     | Organe                             | k.A.                                       | <sup>a</sup> vermutlich einmal | IPPEN & SCHRÖDER, 1977             |
| Deutschland; PH + Zoos                 | 92    | 21     | Organe                             | k.A.                                       | <sup>a</sup> vermutlich einmal | GÖBEL & SCHILDGER, 1990            |
|  | 60    | 8      | kranke                             |  |                                |                                    |
| Zoologischer Garten Leipzig            | 83    | 9,5    | Organe, gesunde, kranke            | S  | <sup>a</sup> vermutlich einmal | ELZE et al., 1977                  |

**Abkürzungen:** A: Arizonakeime; k.A.: keine Angaben; KT: Kloakentupfer; n: Anzahl untersuchter Tiere; PH.: Privathaltung; S: Salmonellen; ZH: Zoohandlung; % pos.: Anteil der salmonellenpositiven Tiere; <sup>a</sup>: keine eindeutigen Angaben in der Literatur; <sup>1</sup>: Iguana iguana

Alle Autoren sind sich einig, dass Arizonakeime von allen Reptiliengruppen bei Schlangen am häufigsten vorkommen (DIMOW et al., 1961; LIE, 1968; HABERMALZ & PIETZSCH 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976), sogar häufiger als Salmonellen aus anderen Subspezies (IVESON et al., 1969; IVESON, 1971; WUTHE et al., 1979; CAMBRE et al., 1980; FRICK, 1987; GREENBERG & SECHTER, 1992). Überhaupt weisen diese Reptilien die größte Vielfalt an Salmonellenserovaren auf (HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976).

Laut DORRESTEIN et al. (2000) macht die Subspezies III, in der viele laktosepositive Stämme vorkommen (WUTHE et al., 1979), bei Schlangen 75 % aus; aber auch Subspezies I tritt auf, II und IV jedoch eher selten.



Die Nachweisraten von Salmonellen bei Schlangen sind in Tabelle 4 dargestellt:

**Tab. 4:** Häufigkeit von Salmonellen bei Schlangen

| Herkunft                                    | n               | % pos.                    | Probenart                                    | Untersuchung                                    | Autor                        |
|---|-----------------|---------------------------|--|---|------------------------------|
| Anatolien; wild                             | 28              | 100                       | KT   | einmal  | FRICK, 1987 <sup>1</sup>     |
| Australien;<br>wild                         | 60              | 98                        | Einstreu + KT;<br>gesunde, aktive,<br>adulte | z.T. mehrfach;<br>ges. 113 Proben<br>untersucht | IVESON, 1971 <sup>2</sup>    |
| Australien;<br>gefangen + wild              | 40              | 92                        | KT + Organe                                  | meist einmal                                    | IVESON et al., 1969          |
| Deutschland + Öster-<br>reich; Züchter + ZH | 65              | 73                        | Kot  | einmal  | GEUE &<br>LÖSCHNER, 2002     |
| Norddeutschland;<br>wild                    | 31 <sup>3</sup> | 68                        | KT   | einmal  | WUTHE et al., 1979           |
|   | 49 <sup>4</sup> | ges. 59<br>SH 75<br>NS 29 |  |   |                              |
| USA; Zoo                                    | 125             | 55                        | KT + Organe                                  | z.T. mehrfach                                   | CAMBRE et al.,<br>1980       |
| Frankfurter Zoo                             | 70              | 54                        | Kot  | z.T. mehrfach                                   | LIE, 1969                    |
| Kanada; PH + ZH                             | 90              | 51                        | Organe                                       | k.A.  | ONDERKA &<br>FINLAYSON, 1985 |
| Niederlande;<br>PH, ZH, Zoos                | 398             | 37                        | Organe, Kot u.a.;<br>kranke + gesunde        | k.A.  | DORRESTEIN et<br>al., 2000   |
|   | 256             | 34                        | Organe                                       |   |                              |
|   | 59              | 10                        | gesunde                                      |   |                              |
| Deutschland;<br>PH, ZH, Zoos                | 618             | 36                        | Organe                                       | k.A.  | SCHRÖDER, 1970               |
|   | k.A.            | 27                        |  |   | SCHRÖDER, 1990               |
|   | 1811            | 27                        | Organe                                       | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal               | IPPEN &<br>SCHRÖDER, 1977    |
| Deutschland;<br>PH + Zoos                   | 34              | 23                        | Organe                                       | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal               | GÖBEL &<br>SCHILDGER, 1990   |
|   | 36              | 18                        | kranke                                       |   |                              |
| PH, Kölner Zoo +<br>Tierpark Hellabrunn     | 24              | 16 S +<br>12 A            | Kot  | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal               | ROGGENDORF &<br>MÜLLER, 1976 |
| Zoologischer<br>Garten Leipzig              | 84              | 13                        | gesunde, kranke,<br>Organe                   | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal               | ELZE et al., 1977            |

**Abkürzungen:** A: Arizonakeime; k.A.: keine Angaben; KT: Kloakentupfer; ges.: gesamt; n: Anzahl untersuchter Tiere, NS: Niedersachsen; PH: Privathaltung; S: Salmonellen; SH: Schleswig-Holstein; ZH: Zoohandlung; % pos.: Anteil der salmonellenpositiven Tiere; <sup>a</sup>: keine eindeutigen Angaben in der Literatur; <sup>1</sup>: Streifenringelnattern, *Natrix natrix persa* [Pallas]; <sup>2</sup>: Tigerottern, *Notechis scutatus*; <sup>3</sup>: Kreuzottern, *Vipera berus* L.; <sup>4</sup>: Ringelnattern, *Natrix natrix* L

### 2.1.3.8 Salmonellen bei Krokodilen

Entsprechend dem selteneren Vorkommen von Krokodilen sind die Untersuchungen von Salmonellen bei diesen Tieren ebenfalls weniger zahlreich. Eine Zusammenstellung ist in



Tabelle 5 gegeben. IVESON et al. (1969) können aus den beiden von ihnen untersuchten Krokodilen zwar Salmonellen, aber keine Arizonakeime isolieren. ROGGENDORF & MÜLLER (1976) untersuchen zwei Krokodile, finden bei ihnen aber keine Salmonellen. MADSEN (1994) untersucht wöchentlich den Salmonellengehalt in Wasserproben von Bassinwasser von vier Krokodilfarmen in Simbabwe. Nilkrokodile, *Crocodylus niloticus*, werden in Afrika zur Fleisch- und Lederproduktion gezüchtet. Da die einzelnen Farmen ihre Becken mit Wasser verschiedener Herkunft und Qualität befüllen und trotz intensiver Hygienemaßnahmen in allen Proben hohe Salmonellenzahlen entdeckt werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Krokodile selbst die Hauptquelle – wenn nicht gar die einzige überhaupt – für die Salmonellen sind, die in ihrem Teichwasser nachgewiesen werden.

**Tab. 5:** Häufigkeit von Salmonellen bei Krokodilen

| Herkunft                                     | n     | % pos. | Probenart                             | Untersuchung                      | Autor                        |
|--|-------|--------|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Australien                                   | 2     | 100    | KT + Organe                           | einmal                            | IVESON et al., 1969          |
| Deutschland; PH,<br>ZH, Zoos                 | 75    | 36     | Organe                                | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal | SCHRÖDER, 1970               |
|  | k. A. | 21     |                                       | SCHRÖDER, 1990                    |                              |
| Niederlande;<br>PH, ZH, Zoos                 | 25    | 16     | Organe, Kot u.a.;<br>kranke + gesunde | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal | DORRESTEIN et al.,<br>2000   |
|  | 19    | 11     | Organe                                |                                   |                              |
|  | 18    | 5      | gesunde                               |                                   |                              |
| PH, Kölner Zoo +<br>Tierpark Hel-<br>labrunn | 2     | 0      | Kot                                   | <sup>a</sup> vermutlich<br>einmal | ROGGENDORF &<br>MÜLLER, 1976 |

**Abkürzungen:** k.A.: keine Angaben; KT: Kloakentupfer; n: Anzahl untersuchter Tiere; PH: Privathaltung; ZH: Zoohandlung; % pos.: Anteil der salmonellenpositiven Tiere; <sup>a</sup>: keine eindeutigen Angaben in der Literatur

### 2.1.4 Pathogenität der Salmonellen für Reptilien

Die Frage der Pathogenität der Salmonellen für Reptilien ist letztendlich nicht geklärt. In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben darüber, ob diese Keime für Reptilien pathogen sind oder nicht. Manche Autoren vertreten die Meinung, dass Salmonellen bei Reptilien zur normalen Darmflora gehören (DIMOW, 1966b; MCCOY & SEIDLER, 1973; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; KELLY et al., 1995; DORRESTEIN et al., 2000), andere warnen vor dieser Einschätzung und bezeichnen sie als fakultativ pathogene Keime (LIE, 1968; WEBER & PIETZSCH, 1974; CAMBRE et al., 1980; KALVIG et al., 1991), und wie-



der andere weisen bestimmte Erkrankungen oder Organveränderungen eindeutig den Salmonellen zu (RUDAT et al., 1966; ONDERKA & FINLAYSON, 1985). Fest steht, dass Reptilien zu einem hohen Prozentsatz mit Salmonellen infiziert sind und diese auch ihr ganzes Leben lang dauernd oder zumindest intermittierend ausscheiden (BÖVRE & SANDBU, 1959; GEBAUER, 1954; DIMOW, 1965a und b, 1966b; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; CAMBRE et al., 1980; D'AOUST et al., 1990; DORRESTEIN et al., 2000), aber nicht oder nur selten klinisch erkranken (BOYCOTT et al., 1953; OTIS & BEHLER, 1973; WEBER & PIETZSCH, 1974; SELBITZ & ENGELMANN, 1984; KALVIG et al., 1991; GEUE & LÖSCHNER, 2002). Somit bilden sie ein natürliches Reservoir für Salmonellen (IVESON et al., 1969; COHEN et al., 1980; CHIODINI & SUNDBERG, 1981; WOODWARD et al., 1997; GEUE & LÖSCHNER, 2002), an dem sich andere Tiere anstecken können. Bei Belastung durch negative Einflüsse können latente Träger derart geschwächt werden, dass sie schwere systemische Infektionen entwickeln (MARCUS, 1971; KALVIG et al., 1991; SUEDERMEYER, 1999; DORRESTEIN et al., 2000); diese waren bisher jedoch nicht reproduzierbar, und es konnte noch nicht geklärt werden, welche Faktoren dafür verantwortlich sind (WEBER & PIETZSCH, 1974).

Die meisten Untersuchungen wurden an wilden oder in Gefangenschaft lebenden, offensichtlich gesunden Tieren durchgeführt (LIE, 1968; DIMOW et al., 1961; DIMOW, 1966a, b und c; KOOPMAN & JANSSEN, 1973); einige sind das Ergebnis von Sektionen, wobei die Todesursache unterschiedlich ist und teilweise nicht einwandfrei geklärt werden kann. Salmonellen sind oftmals nur Zufallsbefunde und tragen nach Ansicht von GEBAUER (1954) und BÖVRE & SANDBU (1959) nicht unmittelbar zum Tode bei.

#### **2.1.4.1 Übertragung und Infektionswege bei Reptilien**

Schon die Frage, wo und auf welche Weise die Salmonelleninfektion stattfindet, ist nicht sicher geklärt (KAUFMANN & MORRISON, 1966). Vermutlich stecken sich die Reptilien schon in ihrem Ursprungsland an (BOYCOTT et al., 1953; GEBAUER, 1954; WILLIAMS & HELSDON, 1965; RUDAT et al. 1966; BOAM, 1970; MAYER & FRANK, 1974; WEBER & PIETZSCH, 1974; ONDERKA & FINLAYSON, 1985; SCHRÖDER, 1990). Hinweise dafür sehen BÖVRE & SANDBU (1959), LIE (1968) und GEUE &



LÖSCHNER (2002) im Vorkommen der gleichen seltenen Serovare in bestimmten Gegenden und in Tieren, die von dort stammen. Die Tatsache, dass bei wilden Tieren aus entlegenen Regionen *Salmonella* Typhimurium nicht nachgewiesen werden kann, während dieses Serovar in der Nutztierhaltung weit verbreitet ist, schließt eine externe Kontamination solcher Gebiete aus und beweist das Vorhandensein natürlicher Salmonellenreservoirs, an denen sich wilde Tiere infizieren können (IVESON et al., 1969; FRICK, 1987).

Für die hohe Inzidenz bei den vegetarischen Landschildkröten machen manche Autoren die gerade bei diesen Tieren ausgeprägte Koprophagie verantwortlich (KIESEWALTER et al. 1960; SCHRÖDER, 1970; SELBITZ & ENGELMANN, 1984; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; SCHRÖDER, 1985; SCHRÖDER, 1990), die aber von anderen bestritten bzw. als unphysiologisch bezeichnet wird (BOYCOTT et al., 1953; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976). DALTON et al. (1995) und MERMIN et al. (1997) erklären die hohen Nachweisraten von Salmonellen bei Grünen Leguanen damit, dass die Schlüpflinge Fäzes von erwachsenen Tieren aufnehmen, um die normale intestinale Flora für die Dickdarmfermentation zu etablieren. Dies ist ein für vegetarische Echsen typisches Verhalten.

In den USA wurde bereits aus frisch geschlüpften Wasserschildkröten, die weder Futter noch Wasser aufgenommen hatten, in großem Umfang Salmonellen isoliert. Da auch Schlüpflinge aus Eiern, die in sterilen Behältnissen künstlich ausgebrütet wurden und noch niemals Kontakt zur kontaminierten Umgebung ihrer Eltern hatten, salmonellenpositiv getestet wurden, ist eine Eiiinfektion wahrscheinlich; diese kommt dadurch zustande, dass die Bakterien die Eischale entweder schon während des Legevorganges in der Kloake des Weibchens oder kurz nach der Eiablage in die kontaminierte Umwelt penetrieren (KAUFMANN & MORRISON, 1966; MICHAEL-MARLER et al., 1983; SCHRÖDER, 1984; D'AOUST et al., 1990). Auch eine transovarielle Übertragung wie beim Geflügel wird diskutiert (KAUFMANN & MORRISON, 1966; SCHRÖDER, 1985; D'AOUST et al., 1990; MERMIN et al., 1997). Nach DORRESTEIN et al. (2000) wurden in den USA viele, wenn nicht alle Wasserschildkröten in abwasserverschmutzten Teichen gezüchtet; KAUFMANN (1966) berichtet von einem „besonders geschäftstüchtigen“ Züchter, der einer Gemeinde vorschlug, ihre Versitzgruben als Zuchtbecken für seine Schildkröten zu benutzen.

Überbesatz in Zuchtfarmen, in denen die Reptilien zu Tausenden in einem Gehege gehalten werden, bietet eine gute Möglichkeit für fäkal-orale Übertragung von Salmonellen



(KAUFMANN, 1966; CHIODINI & SUNDBERG, 1981; ACKMAN et al., 1995; DALTON et al., 1995).

Eine weitere Ursache für die hohe Salmonelleninzidenz bei Reptilien besteht in Schmier- und Kontaktinfektionen auf dem Transport oder bei der Zwischenlagerung bei Großhändlern (BOYCOTT et al. 1953; KIESEWALTER et al., 1960; RUDAT et al., 1966; WEBER & PIETZSCH, 1974; ACKMAN et al., 1995). Salmonellenausscheider können die Bakterien leicht verbreiten, wenn die Tiere unter hygienisch völlig unzureichenden Bedingungen zu Hunderten in engen Kisten zusammengepfercht sind (BAKER et al., 1972). Nach Angaben von BOYCOTT et al. (1953) wurden Maurische Landschildkröten in großer Zahl von der Mittelmeerküste nach England importiert, allein im Jahr 1951 mindestens 300 000 Tiere; über ein Viertel starb auf der Reise: Die Schildkröten wurden durch das Gewicht der über ihnen liegenden Tiere erdrückt oder durch angesammelten Kot erstickt. Das üblicherweise durchgeführte Besprühen der übereinandergestapelten Transportbehälter mit Wasser begünstigt die Keimausbreitung, da infolge des Durchtropfens des verunreinigten Sprühwassers Bakterien aus oben liegenden Kisten in die unteren gespült werden. Während kranke Tiere früher auf den oft wochen- bis monatelangen Transporten häufig starben und somit als Infektionsquelle in ihrer neuen Heimat ausschieden, erreichen heutzutage durch die kürzeren Transportzeiten auch immer mehr schwache und kranke Tiere ihren Bestimmungsort und tragen dort zur Ausbreitung der Salmonellen bei (SCHRÖDER, 1970; BAKER et al., 1972). KIESEWALTER et al. (1960) vermuten wegen der Schmierinfektion auf dem Transport eine höhere Inzidenz bei Schildkröten in Gefangenschaft als in der Natur.

Die gegenseitige Infektion bei Reptilien ist umstritten. Dafür spricht, dass bei vielen seit langem zusammenlebenden Tieren die gleichen Serovare nachgewiesen werden können (KIESEWALTER et al., 1960; LIE, 1968; WEBER & PIETZSCH, 1974; ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; MERMIN et al., 1997; DORRESTEIN et al., 2000). Salmonellen mit identischem Serovar, Plasmidprofil und Genotyp wurden bei verschiedenen Tieren innerhalb eines Bestandes gefunden, niemals jedoch bei Tieren von verschiedenen Besitzern; dies bestätigt die Möglichkeit der horizontalen Übertragung, wenn erst einmal ein Tier infiziert ist (GEUE & LÖSCHNER, 2002). Von anderen Autoren wird die Ausbreitungstendenz der Salmonellen unter den Reptilien nur als mäßig eingeschätzt (DIMOW, 1965a; PRUKSARAJ, 1967; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; WUTHE et al., 1979). Als Indiz dafür sehen



DORRESTEIN et al. (2000) die seltene Übereinstimmung der Serovare: In größeren Beständen wurden viele verschiedene Serovare isoliert, die sich zu weniger als 8 % überlappten.

In Gefangenschaft stellen kontaminierte Futtermittel und Gerätschaften, wiedereingesetzte Futtertiere, freilebende Vögel und Nagetiere, Schaben, Ameisen und Fliegen, in Zoos aber auch Wasserläufe und das Personal Infektionsquellen dar (FRICK, 1987; SCHRÖDER, 1990). So können RUDAT et al. (1966) außer bei Zooreptilien auch bei Schaben Salmonellen nachweisen. Dies ist deshalb interessant, weil es beweist, dass diese Schädlinge, die in Zoos weit verbreitet sind und verschiedene Krankheitserreger übertragen wie z.B. Amöben, *Entamoeba invadens*, die gerade für Reptilien eine besondere Gefahr darstellen (RUDAT et al., 1966; IPPEN & SCHRÖDER, 1977), auch als Vektoren für Salmonellen in Frage kommen. Bei ebenfalls mituntersuchten Ameisen können RUDAT et al. (1966) diese Bakterien nicht feststellen, jedoch isolieren HABERMALZ & PIETZSCH (1973) sie aus einer Ameise aus einem Reptilienkäfig im Berliner Aquarium. Eine weitere Übertragungsmöglichkeit entsteht durch Schadmäuse, wie KULKA et al. (1994) anschaulich darlegen: Die Mäuse infizierten sich in der Futterküche einer Zooabteilung an kontaminiertem Eierbruch mit einem Salmonellentyp, der für Legehennenbestände charakteristisch ist; eben diesen Erreger verbreiteten sie dann mit ihrem Kot im angrenzenden Tierbestand, in dem Erkrankungen und Todesfälle auftraten. Aus den zum Verfüttern zubereiteten, gekochten Eiern konnte der Keim dagegen nicht angezüchtet werden.

Die oft geäußerte Ansicht, dass sich Reptilien durch Fütterung von Schlachtabfällen mit Salmonellen infizieren (KAUFMANN, 1966; CHIODINI & SUNDBERG, 1981), wird von DORRESTEIN et al. (2000) bezweifelt, da keine Übereinstimmung der Serovare vorliegt.

#### **2.1.4.2 Infektionsversuche**

Um nun die tatsächliche Pathogenität der Salmonellen für Reptilien zu erforschen, wurden Infektionsversuche an Schildkröten, Eidechsen und Schlangen durchgeführt (DIMOW, 1966b, c und d; DIMOW et al., 1967).

Nach oraler Verabreichung wird das Agens bei allen Tieren bereits nach einigen Stunden mit dem Kot ausgeschieden, doch in den Organen können weder makroskopische noch mikroskopische Veränderungen festgestellt, noch die applizierten Keime isoliert werden; im Se-



rum sind keine spezifischen Antikörper nachweisbar. Schildkröten behalten sogar unter schlechten Haltungsbedingungen ihr gutes Allgemeinbefinden bis zum Versuchsende.

Nach intraperitonealer, intrakardialer oder subkutaner Infektion werden die Bakterien ebenfalls nach wenigen Stunden im Kot ausgeschieden. Nach einer gewissen Zeit können im Serum spezifische Antikörper gegen das applizierte Agens nachgewiesen werden. Bei den Schildkröten sind in den Organen keinerlei Veränderungen zu finden; Salmonellen können aus Organen nicht, Arizonakeime bis zum Versuchsende aus der Leber angezüchtet werden; es werden keine Krankheitsanzeichen beobachtet. Von den Eidechsen und Schlangen sterben einige bereits nach kurzer Zeit, bei den anderen können weder Krankheitsanzeichen noch Organveränderungen festgestellt werden; die Bakterien können nach 24 Stunden bis zum Versuchsende in der Leber und im Kot nachgewiesen werden, im Blut bis zum 60. Tag; spezifische Antikörper werden gebildet.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch CALDWELL & RYERSON (1939) bei ihren Infektionsversuchen.

In einem weiteren Experiment hält DIMOW (1965a und b) gesunde, salmonellenpositive *T. graeca* und *T. hermanni* unter schlechten Bedingungen in engen Kisten in einem feuchten Raum ohne Futter und Wasser, um ihre Widerstandskraft herabzusetzen und günstige Voraussetzungen für die Erkrankung zu bieten. Die Tiere werden insgesamt 24 Monate beobachtet. Immer wieder werden Kotproben untersucht, in gewissen Intervallen Tiere getötet und seziiert. Bei keinem einzigen Tier können klinische Krankheitsanzeichen oder morphologische Veränderungen von Organen als Zeichen symptomlos verlaufener Erkrankungen entdeckt werden, in den Seren werden keine spezifischen Agglutinine gebildet, die bakteriologische Untersuchung von Leber und Blut bleibt stets negativ. Während der ganzen Beobachtungszeit werden Salmonellen mit dem Kot ausgeschieden, bei jedem Tier aber immer nur die Serovare, die es auch schon bei Versuchsbeginn hatte. Bei einer zweiten Versuchsgruppe, die unter guten Bedingungen gehalten, gefüttert und getränkt wurde, schieden nach einiger Zeit 12 % der Tiere Serovare aus, die vorher bei ihnen nicht entdeckt worden waren, wohl aber bei anderen Schildkröten ihrer Gruppe.

Dimow kommt zu dem Schluss, dass Salmonellen und Arizonakeime für Schildkröten auch unter schlechten Bedingungen nicht pathogen sind, die Keime die Darmbarriere nicht durchbrechen und nicht in die inneren Organe einwandern; die gegenseitige Ansteckung ist bei ihnen nicht sehr weit verbreitet, die Salmonellenausscheidung aber dauerhaft.



### 2.1.4.3 Klinische Erkrankungen und pathologisch-anatomische Veränderungen

Klinische Erkrankungen durch Salmonellen bei Reptilien sind sehr selten ausgeprägt, gelegentlich zeigen sich akute Enteritis und evtl. Septikämie, Pneumonie, Peritonitis, schwere Hepatitis, Nephritis, Myo- und Perikariditis, hypovolämischer Schock und Tod. Ab und zu bilden sich Abszesse mit eitrigen Knocheneinschmelzungen und andere Veränderungen, die den Tod des Tieres herbeiführen. Manchmal wird das Absetzen von stinkendem, breiigem Kot mit Schleim- und Blutbeimengungen beobachtet; evtl. können Aufzuchtprobleme auf eine Salmonelleninfektion hinweisen (RUDAT et al., 1966; FRANK & LOOS-FRANK, 1977; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; SCHRÖDER, 1985 und 1990; GÖBEL & SCHILDGER, 1990; DORRESTEIN et al., 2000).

Pathologisch-anatomische Veränderungen liegen am ehesten noch bei einer Bakteriämie vor. Deshalb findet man sie nicht in bestimmten Organen, sondern in mehreren Organsystemen. Schildkröten weisen oftmals keine oder nur geringfügige Veränderungen auf. Üblicherweise sind sie im Magen-Darm-Trakt, in Leber, Milz und den Arteriolen verschiedener Organe nachzuweisen und reichen von akut fibronekrotisch bis granulomatös. Manchmal existieren akute und chronische Prozesse nebeneinander im gleichen Gewebe. Auch diphteroide, kleieartige, gelbbraune Beläge auf der Magen- und Darmschleimhaut und eitrige Entzündungen in den Lungensäcken werden beschrieben (CAMBRE et al., 1980; SCHRÖDER, 1985; FRICK 1987; GÖBEL & SCHILDGER, 1990). Bei 50 % der an generalisierter Salmonellose erkrankten Reptilien sind die Lungen mitbeteiligt, wobei die Veränderungen unspezifisch sind (IPPEN, 1968). Aus pathologisch veränderten Lebern wurden Salmonellen und Arizonakeime isoliert (WILL, 1975). PRUKSARAJ (1967) findet sehr ähnliche histologische Veränderungen bei salmonellenpositiven und -negativen Schildkröten. CAMBRE et al. (1980) können Salmonellen bei lebenden Reptilien häufiger nachweisen als bei Sektionen.

Die makroskopischen und mikroskopischen, teils akuten, teils chronischen Veränderungen und klinische Erkrankungen können allerdings nicht einwandfrei den Salmonellen zugeschrieben werden, da oftmals in Bakterienkulturen neben Salmonellen auch andere Krankheitserreger enthalten sind und häufig resistenzmindernde Zweiterkrankungen, besonders durch Parasiten wie Würmer und Amöben, oder Managementprobleme vorliegen, welche die unmittelbare Todesursache ausmachen (PRUKSARAJ, 1967; COWAN, 1968; CAMBRE et al., 1980; CHIODINI & SUNDBERG, 1981; SCHRÖDER, 1985; FRICK, 1987;



DORRESTEIN et al., 2000; GEUE & LÖSCHNER, 2002). Salmonellen können dann zum Ableben der Tiere beitragen.

In der Literatur existieren nur wenige Berichte über tödliche Salmonelleninfektionen bei Reptilien (SUEDERMAYER, 1999).

RUDAT et al. (1966) finden in einem Orbitalabszess einer Griechischen Landschildkröte reichlich Salmonellen, SCHRÖDER (1970) isoliert sie aus der Galle einer Sternschildkröte, *Testudo elegans*, heute *Geochelone elegans*, die an katarrhalischer Darmentzündung litt.

KALVIG et al. (1991) führen einige Krankheitsfälle bei Stachelleguanen, *Sceloporus variabilis*, auf Salmonellen zurück. Die Tiere erschienen zunächst gesund, entwickelten aber bald Schwellungen an den Hintergliedmaßen, meist an den Hüftgelenken, und ihr Allgemeinbefinden verschlechterte sich so, dass sie euthanasiert werden mussten. Bei der Sektion wurden eitrige Arthritis und Periarthritis, Myelitis, Osteomyelitis und in einem Fall ein großer periarthikulärer Abszess diagnostiziert. Die überlebenden waren z.T. ebenfalls salmonellenpositiv. Sie wurden nach drei Monaten getötet und sezirt; bei einigen wurde eine multifokale lymphozytäre oder nekrotisierende Hepatitis diagnostiziert. Bei einem Schwarzleguan, *Ctenosaura acanthinura*, bildete sich ein Abszess am Vorderbein, das Allgemeinbefinden sank und das Tier starb. Bei der Sektion zeigten sich multiple knotige, käsige Abszesse in Lunge, Leber, Niere und Darmwand (BOAM et al., 1970). Ebenfalls aus multiplen Abszessen bei einem Anolis, *Anolis spec.*, isolierten MAYER & FRANK (1974) Arizonakeime in Reinkultur. Nach Beobachtungen von ONDERKA & FINLAYSON (1985) verursachte die chronische Salmonellose bei einem Leguan eine fibrosierende, interstitielle Nephritis, eine Ameive, *Ameiva spec.*, und ein Leguan litten an Oophoritis, bei zwei Leguanen war die Infektion mit einer Myokarditis und bei einem weiteren mit einer Aortenklappenendokarditis verbunden. SUE-  
DERMEYER (1999) berichtet von einem Steppenwaran, *Varanus exanthematicus*, der komatös eingeliefert wurde und nach drei Tagen verendete. Die Blutuntersuchung ergab eine Leukozytose, die bakteriologische Untersuchung eine Salmonellen-Reinkultur. Bei der Sektion fiel lediglich eine hyperämische Darmschleimhaut auf, histopathologisch wurden bakterielle Enteritis, Lebernekrose und Bakteriämie festgestellt. Die drei verbleibenden, ebenfalls salmonellenpositiven Warane wurden sofort antibiotisch behandelt, überlebten und wurden bei gelegentlicher Untersuchung in den folgenden Jahren negativ getestet. Der Autor vermutet, dass die eine Woche vor Erkrankung aufgetretenen innerartlichen Aggressionen eine Immunsuppression bewirkt haben und in der Folge die Krankheit ausbrechen konnte.



Bei Schlangen manifestiert sich die Salmonellose gewöhnlich als ernste, subakute, nekrotisierende Enteritis, wobei der gesamte Darm, häufig aber nur die hintere Darmhälfte betroffen ist. Im Falle einer Septikämie entwickelt sich eine subakute Hepatitis, teilweise mit Granulombildung. Es kann sich eine Salmonellenpneumonie entwickeln, histologisch findet sich dann eine interstitielle Infiltration mit Entzündungszellen und Fibrinexsudation in die Alveolen (ONDERKA & FINLAYSON, 1985). Bei einer doppelköpfigen Königsnatter, *Lampropeltis spec.*, die ohne Krankheitssymptome plötzlich gestorben ist, enthielt die rechte, missgebildete Trachea massenhaft grüngelben Eiter; aus diesem konnten Salmonellen in Reinkultur isoliert werden. Die gut ausgebildete linke Trachea, die Lunge und alle übrigen Organe waren unverändert. Eine Dreistreifen-Rosaboa, *Lichanura trivirgata*, zeigte Inappetenz und postprandiales Erbrechen mit blutigen und schleimigen Beimengungen. Sie starb sechs Tage nach Auftreten der ersten Symptome. Bei der Sektion erschien die Magenwand verdickt mit fibronekrotischen Ablagerungen auf der Schleimhaut und gelblichen, nekrotischen Läsionen. Andere Organe waren unauffällig. Aus dem Magen wurden als einzige Bakterien Salmonellen angezüchtet, alle anderen Organe waren steril. Die immunhistologische Untersuchung ergab bei beiden Schlangen einen direkten Zusammenhang zwischen den Salmonellen und den aufgetretenen Organveränderungen (ORÓS et al., 1996). SCHRÖDER (1970) isoliert Salmonellen aus der Galle einer Grünen Mamba, *Dendroaspis viridis*, mit hochgradiger Leberveränderung. LAMBERSKI et al. (2002) berichten von einer Klapperschlange, *Crotalus adamanteus*, und drei Pythons, *Morelia spec.*, mit einer Arizona-Bakteriämie. Zwei Schlangen waren lethargisch, eine war unauffällig, und eine hatte seit sieben Monaten die Nahrungsaufnahme verweigert. Trotz antibiotischer Behandlung mit einem im Resistenztest wirksamen Antibiotikum starben die ersten drei Tiere nach wenigen Tagen, das vierte erholte sich, wurde aber acht Monate später eingeschläfert. Bei den letzten drei Schlangen wurde das gleiche Serovar isoliert, das bei zwei Schlangen identische PFGE-Muster (Pulsfeld-Gelelektrophorese) aufwies; das der dritten Schlange unterschied sich nur geringfügig und wurde daher als nahe verwandt eingestuft. Bei der ersten Schlange wurde ein Serovar mit sehr ähnlicher Antigenformel gefunden, das sich aber hinsichtlich der PFGE-Muster deutlich unterschied. Die vier Schlangen waren in getrennten Terrarien in einem Raum gehalten worden. Aus dem Darminhalt einer Königsnatter, *Lampropeltis getula*, wurde ein anscheinend nicht pathogener Arizona-Stamm isoliert; diese Schlange wurde in einem anderen Raum gehalten als die vorherigen, aber vom gleichen Tierpfleger versorgt.



Laut DORRESTEIN et al. (2000) besteht eine spezielle Pathogenität bestimmter Serovare für Reptilien nicht. In 83 Fällen, in denen Salmonellen aus anderen Organen als dem Darm – meist der Leber – isoliert wurden, waren 60 Serovare involviert. Ein einziges Serovar, ein Vertreter aus der Subspezies III, kam insgesamt 13 mal vor, 12 mal davon bei einer Septikämie – und 10 mal davon bei einer Schlange. Dagegen behauptet FRICK (1987), die Tatsache, dass Arizonakeime in der Fäkalflora von gesunden Schlangen gegenüber Subspezies I-Salmonellen überwiegen, in Schlangenkadavern jedoch eine Dominanz von I (68 %) gegenüber III (16 %) – Rest II und IV – herrscht, spricht für eine höhere Pathogenität der Subspezies I-Salmonellen bei Schlangen, während Subspezies III-Salmonellen eher zur Normalflora gerechnet werden können und nur unter bestimmten Voraussetzungen eine pathogene Potenz erlangen.

## **2.1.5 Pathogenität der Reptiliensalmonellen für den Menschen**

### **2.1.5.1 Allgemein**

Da Reptilien – wie ausführlich dargelegt wurde – ein natürliches Reservoir für Salmonellen sind und sie über lange Zeit hinweg ausscheiden, jedoch nur selten daran erkranken, stellen sie eine ständige Infektionsquelle für andere Tiere und den Menschen dar. Der normale Erwachsene ist dabei nicht so sehr gefährdet. Vielmehr sind Babys und Kleinkinder, bei denen das Immunsystem noch nicht genügend ausgebildet ist, und sehr alte Leute, bei denen es nicht mehr voll funktionstüchtig ist, besonders empfänglich. Auch Personen mit einer Magenresektion, bei denen die Ingesta nur noch einer verkürzten Einwirkzeit der Magensäure unterliegt, mit defektem Immunsystem, wie beispielsweise AIDS-Kranke oder Patienten mit Knochenmarkskrebs, mit unterdrückter Immunabwehr nach Transplantationen oder mit Autoimmunerkrankungen und Schwangere sind prädisponiert. Kleine Kinder sind besonders auch deshalb anfälliger, weil bei ihnen der pH-Wert im Magen, genau wie bei sehr alten Leuten, wegen ungenügender HCl-Bildung relativ hoch ist und eine schnelle Magenentleerung stattfindet (BLASER & NEWMAN, 1982; ACKMAN et al., 1995). Ein markantes Beispiel für die unterschiedliche Empfänglichkeit für den gleichen Krankheitserreger bei Gesunden und Vorgeschiedigten liefert die Untersuchung von JAFARI et al. (2002): Zwei Frauen beka-



men eine Thrombozytentransfusion vom gleichen Spender. Die erste war drei Wochen zuvor wegen akuter Leukämie eingeliefert und behandelt worden; sie war asymptomatisch und stand kurz vor ihrer Entlassung; die zweite wurde am Transfusionstag wegen schwerer innerer Blutungen eingeliefert; als Folge einer Zirrhose und Splenomegalie verbunden mit Alkoholismus und chronischer Hepatitis C hatte sie eine chronische Thrombozytopenie. Noch während der Transfusion stellten sich bei beiden Patientinnen ähnliche Symptome ein: Fieber, Schüttelfrost, Schwindel, Erbrechen, Atemnot, Tachykardie, Hämatemesis und Blutdruckabfall. Sie wurden sofort antibiotisch und intensivmedizinisch behandelt; während die erste Patientin nach zwei Wochen extubiert, nach drei Wochen von der Dialyse abgehängt und schließlich nach fünf Wochen entlassen werden konnte, verstarb die zweite Patientin nach zwei Tagen. Nachforschungen ergaben, dass der Thrombozytenspender 18 Tage vor der Spende Fieber und blutigen Durchfall hatte, Antibiotika einnahm und nach fünf Tagen, 13 Tage vor der Spende, symptomlos war. Die Erkrankung war auf eine Divertikulitis geschoben worden. Seine Tochter war eine Woche zuvor mit den gleichen Symptomen erkrankt. Die klinische Untersuchung des Spenders war völlig normal, die Blutkultur blieb steril. Zufällig stellte sich heraus, dass der Mann eine *Boa constrictor* besaß. Aus deren Kotprobe konnte das gleiche Serovar isoliert werden wie aus dem Blut der beiden Patientinnen, PFGE-Muster ließen keinen Zweifel an der Identität der drei Isolate. Durch den Umgang mit seiner Schlange hatte der Mann die Salmonellen erworben; zum Zeitpunkt der Spende hatte er eine symptomlose Bakteriämie. Zusammen mit seinen Thrombozyten wurden die Krankheitserreger auf die Frauen übertragen.

Manche Autoren sind der Meinung, dass die Übertragungsfahr der Salmonellen von Reptilien auf den Menschen nur gering ist, da nur wenige Menschen Reptilien besitzen, diese selten Salmonellen ausscheiden, nicht liebkost werden und nur kurz leben, und weil andere Salmonellen als Subspezies I-Salmonellen den Menschen nicht oder nur selten befallen (BOYCOTT et al., 1953; WILLIAMS & HELSDON, 1965; ONDERKA & FINLAYSON, 1985); auch die Pathogenität der Subspezies III-Salmonellen ist umstritten. WILLIAMS & HELSDON (1965) können diese Keime bei menschlichen Salmonellosen nicht entdecken. LIE (1968) weist darauf hin, dass Arizonakeime zwar nur selten Erkrankungen beim Menschen verursachen, dann aber die gleichen Symptome wie Subspezies I-Salmonellen und sogar reguläre Gruppenerkrankungen hervorrufen. Weitere Angaben über z.T. schwere Arizonainfektionen beim Menschen finden sich bei EDWARDS et al. (1959), IVESON et al. (1969), JEPHCOTT et al.



(1969), HUGHES et al. (1971) und HABERMALZ & PIETZSCH, (1973). Andere seltene Salmonellen, die auch aus Reptilien bereits isoliert wurden, sind immer wieder als Erreger menschlicher Salmonellosen bekannt geworden (LIE, 1968; WEBER & PIETZSCH, 1974); andererseits wurden für den Menschen als hochpathogen bekannte Salmonellen bei Reptilien ebenfalls schon nachgewiesen (KIESEWALTER et al., 1960; RUDAT et al. 1966).

LANG (1961) betont ausdrücklich die Humanpathogenität seltener Salmonellen, und von CALDWELL & RYERSON (1939), BÖVRE & SANDBU (1959) und BOAM (1970) wurde die Pathogenität der Reptiliensalmonellen zumindest für Mäuse und Hasen bewiesen. In-vivo- und in-vitro-Tests beweisen, dass Salmonellen aus Reptilien z.T. eine signifikant höhere Toxizität aufweisen als aus Säugern oder Vögeln isolierte (SCHRÖDER & KARASEK, 1977). Solange nicht das Gegenteil bewiesen ist, sollte man von der allgemeinen Menschenpathogenität aller Salmonellen ausgehen (LANG, 1961; LIE, 1968; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; PIETZSCH, 1981; SCHÖLL, 1982; SELBITZ & ENGELMANN, 1984).

#### **2.1.5.2 Reptilien-assoziierte Salmonellosen**

Erkrankungen beim Menschen durch Salmonellen, die von Reptilien übertragen wurden, sogenannte Reptilien-assoziierte Salmonellosen, sind Gegenstand zahlreicher Berichte aus den USA. Vor allem junge Wasserschildkröten waren früher dort sehr beliebt als Heim- und „Spieltiere“ (ANONYMUS, 2000b) für kleine Kinder: Sie können in kleinen Behältnissen untergebracht werden, machen keinen Lärm, beißen nicht, brauchen wenig Futter und sind billig, sauber und ungefährlich; sie wurden auch oft in Kindergärten und Grundschulen gehalten (WILLIAMS & HELSDON, 1965; JEPHCOTT et al., 1969). Gerade sie waren häufig Ursache einer Salmonelleninfektion mit mehr oder weniger schwerem Verlauf, meistens bei Kindern (WILLIAMS & HELSDON, 1965; LAMM et al., 1972).

Schon um 1940 isolierte man Salmonellen aus Reptilien, ihr Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen wurde zum ersten Mal Mitte des 20. Jahrhundert in England erkannt (BOYCOTT et al., 1953), in den USA erst in den 60ern (ANONYMUS, 1981). In den drei Jahren von 1963 bis 1966 wurden in den USA über 50 Salmonellosefälle bei Menschen bekannt, die nachgewiesenermaßen durch von Schildkröten übertragenen Salmonellen verursacht wurden, und weitere 50, die epidemiologisch mit diesen Tieren zusammenhingen (KAUFMANN & MORRISON, 1966). In den Jahren 1970 und 1971, also keine zehn Jahre



später, waren von zwei Millionen Salmonellosefällen in den USA schätzungsweise 14 %, also etwa 280 000, auf Schildkröten zurückzuführen (LAMM et al. 1972).

Seitdem werden auch in anderen Ländern Schildkröten-assoziierte Salmonellosen bei Menschen beobachtet, z.B. in Kanada (D'AOUST et al., 1990; WOODWARD et al., 1997), England (JEPHCOTT et al., 1969; CLEGG & HEATH, 1975; SANYAL et al., 1997), Japan (FUJITA et al., 1981), Israel (GILJAHN & HALPIN, 1988), Neuseeland (DE HAMEL & MCINNES, 1971) und Italien (DESSI et al., 1992); fast immer sind aus Amerika importierte Rotwangenschmuckschildkröten die Quelle. In Deutschland ist man ebenfalls auf diesen Zusammenhang aufmerksam geworden (ANONYMUS, 2000a und b).

Doch nicht nur Schildkröten, sondern auch Schlangen (KELLY et al., 1995; SANYAL et al., 1997; ANONYMUS, 1999) und Echsen – und hier besonders die beliebten Grünen Leguane – wurden als Ursache von Salmonelleninfektionen identifiziert (KAUFMANN, 1966; DE HAMEL et al. 1971; BAKER et al. 1972; ACKMAN et al., 1995; DALTON et al., 1995; SANYAL et al. 1997). Die Hälfte der Personen erkrankt innerhalb eines Monats, nachdem das Tier in den Haushalt gekommen ist (LAMM et al., 1972; CHIODINI & SUNDBERG, 1981), einige sogar schon nach wenigen Tagen (BAKER et al., 1972; GILJAHN & HALPIN, 1988; ACKMAN et al. 1995; MERMIN et al., 1997). Manche Patienten müssen ins Krankenhaus eingeliefert werden, die Kosten für die medizinische Behandlung gehen in die Millionen (WILLIAMS & HELSDON, 1965; LAMM et al., 1972).

Von Reptilien-assoziierten Salmonellosen werden meistens kleine Kinder betroffen (WILLIAMS & HELSDON, 1965; PRUKSARAJ, 1967; DE HAMEL et al., 1971; COHEN et al., 1980). Bei der Untersuchung von MERMIN et al. (1997) sind 81 % der Erkrankten Kinder unter einem Jahr, während bei den übrigen Salmonellosen diese Altersgruppe nur 14 % ausmacht. Diese kleinen Kinder erkrankten z.T. sehr schwer, während ihre Eltern oder älteren Geschwister, aus deren Stuhlproben oftmals das gleiche Serovar isoliert werden kann, gesund sind oder nur unter leichten Krankheitssymptomen leiden (ROSENSTEIN et al., 1965; BAKER et al., 1972; DESSI et al., 1992; MERMIN et al., 1997).

### **2.1.5.3 Übertragungswege**

Die Übertragungswege sind überaus vielfältig und z.T. subtil; direkter Kontakt mit dem Salmonellen ausscheidenden Reptil ist nicht notwendig, indirekter Kontakt z.B. über



kontaminierte Gegenstände oder Personen, die mit dem infizierten Tier Umgang hatten, kann für eine Übertragung ausreichen (ANONYMUS, 1992a und b; ACKMAN et al., 1995; MERMIN et al., 1997). Bei einer Umfrage sagten 88 % der Erkrankten aus, selbst einen Leguan zu besitzen oder Kontakt zu Leguanhaltern zu haben, nur 14 % gaben an, das Tier berührt zu haben. Beispielsweise konnten Reptilien-assoziierte Salmonellosen auf den Besuch des Babysitters, der Reptilien hält, zurückgeführt werden, oder auf eine Geburtstagsparty bei Freunden, bei denen Reptilien leben (MERMIN et al., 1997). Das Säubern von Einrichtungsgegenständen aus dem Terrarium oder der Wasserwechsel des Aquariums im Küchenspülbecken und das Deponieren der Reptilien während der Käfigreinigung in der Badewanne oder in Schüsseln, von denen später wieder gegessen wird, sind als Infektionsquellen offensichtlich (WILLIAMS & HELSDON, 1965; ANONYMUS, 1992b). Oft besteht allerdings auch ein sehr enger Kontakt zwischen Mensch und Reptil (DALTON et al., 1995; ANONYMUS, 1999). Nach ACKMAN et al. (1995) lassen 45 % ihren Leguan frei in der Wohnung laufen; diese Praxis kann zu unerwarteter Kontamination von Speisen und Gegenständen führen, darüber hinaus können Kinder Fäzes auf dem Boden finden und in den Mund nehmen.

Einige eindrucksvolle Beispiele, wie kleine Kinder Salmonellosen von Reptilien erworben haben, und wie unberechenbar sich Kinder verhalten können, aber auch für gedankenlose Salmonellenübertragung durch die Eltern werden im Folgenden genannt: Ein Vater kletterte barfuß in den Leguankäfig, um diesen zu reinigen, und verbreitete so die Keime in der Wohnung (ANONYMUS, 1992b); ein anderer Vater hat sich nach intensiver Beschäftigung mit seinem Leguan nicht immer die Hände gewaschen, bevor er das Baby fütterte; ein weiterer ließ sein Frühgeborenes zur Beruhigung an seinem Finger nuckeln und gab an, sich nach Handtieren mit seinem Leguan nur selten die Hände zu waschen (DALTON et al., 1995). Bei einem 5 Monate alten Jungen mit einer angeborenen, unheilbaren Immunerkrankung war Sondenernährung nötig; der Vater, Besitzer von 15 Schlangen, beteiligte sich an der Pflege seines Sohnes. Er behauptete, gewissenhaft Hygiene zu betreiben. Trotzdem entwickelte das Kind eine schwere Salmonellose (SANYAL et al., 1997). Ein zweijähriges Mädchen war beobachtet worden, wie es an den bunten Kieselsteinen aus dem Schildkrötenbecken lutschte (WILLIAMS & HELSDON, 1965), ein eineinhalb Jahre altes Kind leckte sich das Bassinwasser von einem Wasserschildkrötenbecken von den Fingern ab, ein zweijähriges Mädchen aß den Kopfsalat aus dem Schildkrötenaquarium, und ein ebenfalls zwei Jahre altes Mädchen steckte die ganze Schildkröte in den Mund. In einem anderen Fall sollten die älteren Ge-



schwister ein sieben Monate altes Mädchen hüten und darauf achten, dass es die Schildkröte nicht anfasst. Später fand die Mutter das Baby im Aquarium, wo es mit der Schildkröte spielte (BAKER et al. 1972). Die gleichen Autoren berichten auch über eine Reptilien-assoziierte Salmonellose bei einer 34-jährigen Frau, die chronische Fingernagelkauerin ist. Bei ALTMAN et al. (1972) erleidet ein Dreijähriger eine Salmonellensepsis, nachdem er sich beim Wasserwechsel in den Finger geschnitten hatte.

In einem Fall konnte das gleiche Serovar außer bei einem Kind und seiner Schildkröte auch noch bei dem Hund und der Katze, die aus dem Aquarium getrunken hatten, nachgewiesen werden (KAUFMANN, 1966).

Ein sechsjähriges Kind zog sich durch Verzehr von rohem, getrocknetem Klapperschlangenfleisch eine ernste Arizonainfektion zu; in lateinamerikanischen Ländern ist Klapperschlangenfleisch Bestandteil der normalen Nahrung und wird auch traditionell in der Volksmedizin verwendet: Zerrieben und in Kapseln abgefüllt soll es bei vielen Erkrankungen wie Rheuma, Diabetes, Sichelzellanämie, angeborenen Herzfehlern, Lupus erythematodes, AIDS u.a. helfen (KELLY et al. 1995).

Die Krankheitssymptome, die bei durch Reptilien übertragenen Salmonellosen beschrieben werden, bestehen in Fieber, Gastroenteritis mit Erbrechen, wässrigem, schleimigem oder blutigem Durchfall, Bauchkrämpfen und Meteorismus, Kopf- und Rückenschmerzen, Wundinfektionen, Septikämie, Arthritis, Meningitis und Hemiplegie. Bei Kindern ist eher mit Komplikationen zu rechnen als bei Erwachsenen (WILLIAMS & HELSDON, 1965; CLEGG & HEATH, 1975; FUJITA et al., 1981; ACKMAN et al., 1995; DALTON et al., 1995; KELLY et al., 1995; WEIL et al., 1995; SANYAL et al., 1997); auch über tödliche Infektionen wurde berichtet (MERMIN et al., 1997; ANONYMUS, 1999; ANONYMUS, 2000b).

### **2.1.6 Konsequenzen**

Nachdem in den USA bekannt wurde, dass Wasserschildkröten Salmonellen auf Menschen übertragen können und viele Meldungen über Erkrankungen vorlagen, wurde 1968 im Bundesstaat Washington der Handel mit Schildkröten soweit eingeschränkt, dass nur Schildkröten, die im Ursprungsland als salmonellenfrei zertifiziert wurden, importiert und verkauft werden durften, und dass in Tierhandlungen, die Reptilien anbieten, Warnschilder den



Kunden auf das Salmonellenproblem hinweisen müssen; dies führte zu einem merklichen Rückgang der Schildkröten-assoziierten Salmonellosen (BAKER et al., 1972; LAMM et al. 1972; ACKMAN et al., 1995). Andere Staaten folgten diesem Beispiel, und 1972 verbot die Food and Drug Administration, kurz FDA, in den USA Import und zwischenstaatlichen Versand von im Ursprungsland nicht als salmonellenfrei zertifizierten Schildkröten. Obwohl zunächst nur eine Bescheinigung über Salmonellenfreiheit erforderlich war, reduzierte sich dadurch die Zahl der zum Verkauf angebotenen Schildkröten; somit beruhte der starke Rückgang der Schildkröten-assoziierten Salmonellosen nicht – wie vorgesehen – auf der Gewährleistung salmonellenfreier Schildkröten, sondern auf der Abnahme der Zahl der verkauften Tiere (MCCOY & SEIDLER, 1973; COHEN, et al., 1980; CHIODINI & SUNDBERG, 1981). Bald wurde offensichtlich, dass diese Regelungen nicht ausreichten: Viele salmonellenfrei zertifizierte Schildkröten beherbergten Salmonellen (SIEBELING et al., 1975; WELLS et al., 1974; COHEN et al., 1980). 1972/73 waren 54 % der zertifizierten Schildkröten bei einem erneuten Test salmonellenpositiv (ANONYMUS, 1975; COHEN et al., 1980). ALTMAN et al. (1972) nennen als einzige Möglichkeit, Schildkröten-assoziierte Salmonellosen zu senken, Schildkröten als Haustiere zu eliminieren.

1975 verbot die FDA in den USA Verkauf und überstaatlichen Versand von embryonierten Schildkröteneiern und Schildkröten kleiner als 10,2 cm Karapaxlänge, mit Ausnahme von Schildkröten für Ausstellungen und Wissenschaft. Die Entscheidung, Schildkröten über 10,2 cm Karapaxlänge für den Verkauf zuzulassen, beruht auf der Annahme, dass größere Schildkröten nicht für Kinder gekauft werden und sie deshalb keinen Umgang mit diesen Tieren haben (COHEN et al., 1980; CHIODINI & SUNDBERG, 1981). Das Animal Welfare Institute befürwortet dieses Verbot und betont, dass die kleinen Schildkröten, die in Tierhandlungen verkauft werden, keine Miniaturschildkröten sind, sondern Schildkrötenbabys, die bei richtiger Pflege sehr alt werden können; die meisten sterben jedoch schon nach zwei Monaten (ANONYMUS, 1975).

Der Sinn dieses Verkaufsverbotes war, die Fälle Schildkröten-assoziiierter Salmonellosen, die durch den verbleibenden legalen Verkauf zertifizierter Schildkröten entstanden waren, zu eliminieren. Es führte in Ländern, die Schildkröten importieren, von 1970-1977 zu einer 77 %-igen Abnahme der Isolationshäufigkeit von Schildkröten-assoziierten Serovaren im Gegensatz zu Ländern, die Schildkröten exportieren; dort fiel keine Veränderung auf. Einen ähnlichen Trend bei nicht Schildkröten-assoziierten Serovaren gab es nicht.



Dieser Rückgang korreliert mit der Abnahme der gesamten Schildkrötenproduktion: Sie sank in den Jahren 1971 und 1972 von 15 Millionen auf 300 000. Außerdem führte das Verkaufsverbot zu einer 18 %-igen Abnahme von Salmonellosen bei Kindern im Alter zwischen einem und neun Jahren. Wegen immer noch auftretender, wenn auch seltener Schildkröten-assoziiierter Salmonellosen bei Kindern wird von einer Lockerung dieses Gesetzes abgeraten. Die Anstrengungen, Schildkröten-assoziierten Salmonellosen zu reduzieren, waren effektiv und haben einen bedeutenden Anteil am Rückgang der Salmonellosen bei Kindern, was dazu ermutigt, Versuche zu unternehmen, weitere Quellen zu identifizieren und zu beseitigen (LAMM et al., 1972; COHEN et al., 1980; ANONYMUS, 1981).

In Kanada wurde 1975 der Import nicht zertifizierter Schildkröten ebenfalls verboten, embryonierte Schildkröteneier sind aber in diesem Verbot nicht erfasst und können die Kontamination verbreiten (D'AOUST et al., 1990; WOODWARD et al., 1997). CLEGG & HEATH (1975) bedauern, dass für den steigenden Schildkrötenimport nach England zwar Lizenzen benötigt werden, die Menge aber nicht begrenzt ist. 1972 wurden über 50 000 Rotwangenschmuckschildkröten importiert. In Japan wird von mancher Seite ebenfalls ein Verkaufsverbot befürwortet (FUJITA, 1981).

Durch die eingeschränkte Erhältlichkeit von Schildkröten wuchs die Popularität anderer Reptilien: Import und Verkauf von Leguanen, insbesondere des Grünen Leguans, *Iguana iguana*, stieg in den USA in den Jahren von 1978 bis 1993 um über 1500 % an. Der Reptilienimport stieg von 1989 bis 1993 um 82 %, der Leguanimport im gleichen Zeitraum um 431 %. Dieser starke Absatz entstand durch ein großes Angebot an jungen, billigen Leguanen, die in Farmen in Süd- und Mittelamerika gezüchtet werden. Von 1993 bis 1994 wurden mehr als eine Million Leguanschlüpflinge in die USA importiert, was analog zu den Schildkröten-assoziierten Salmonellosen einen Anstieg Leguan-assoziiierter Salmonellosen mit sich brachte (ACKMAN et al., 1995; DALTON et al., 1995). MERMIN et al. (1997) schätzen, dass im Jahr 1995 allein durch *Salmonella* Marina zwischen 1500 und 6500 Salmonellosefälle beim Menschen aufgetreten sind. *Salmonella* Marina ist ein seltenes Serovar aus der Subspezies IV, das erstmals 1964 aus einem Meeresleguan, *Amblyrynchus christatus*, nachgewiesen wurde und bei Leguanen vergleichsweise häufig ist (MERMIN et al., 1997; ANONYMUS, 1997). Viele Leguane wurden auch nach Kanada weitertransportiert (WOODWARD et al., 1997). Nach WEIL et al. (1995) besitzen Leguane nicht die enorme allgemeine Beliebtheit, die Schildkröten in der Vergangenheit hatten; Echsen sind weniger attraktiv für Kinder als Babyschildkröten, aber sie



haben eine starke Anziehungskraft auf Jugendliche und junge Erwachsene. 1994 hielten ca. 3 % der Haushalte in den USA insgesamt 7,3 Millionen Reptilien, ca. ein Drittel aller in die USA importierten Reptilien sind Leguane. Diese Tiere ersetzen die Schildkröten als populärste Heimreptilien, Reptilien-assoziierte Salmonellosen flammen wieder auf (MERMING et al., 1997; WOODWARD et al., 1997). Pro Jahr treten in den USA immer noch 93 000 Reptilien-assoziierte Salmonellosen beim Menschen auf, was etwa 7 % der dortigen menschlichen Salmonellosefälle entspricht (ANONYMUS, 1999).

In Deutschland sind von 1977 bis 1992 nur fünf Fälle menschlicher Salmonellosen auf direkten oder indirekten Reptilienkontakt zurückzuführen, zwei davon bei Kleinkindern. Die insgesamt in diesem Zeitraum isolierten Salmonellenstämme aus den Subspezies II bis VI machen zusammen nicht einmal 1 % aller Salmonellenisolate in Deutschland aus (HEINZERLING, 1995). Seit 1993 wurden beim Menschen 41 Salmonellenisolate aus Subspezies IIIb und insgesamt 39 aus den Subspezies IIIa, IV, V und IV isoliert. Die entsprechenden Zahlen für Tiere betragen 102 aus Subspezies IIIb und 104 aus IIIa, IV und V, wobei unter der Rubrik „Tiere“ viele Reptilien enthalten sind, aber keine genauen Angaben vorliegen. Salmonellosen beim Menschen, deren Infektionsquelle nachgewiesenermaßen auf Reptilien zurückzuführen ist, traten im Jahr 2000 zweimal durch Subspezies IV und 2002 ebenfalls zweimal durch Subspezies IIIb und IV auf (TSCHÄPE, H., RABSCH, W. & FRUTH, A., persönliche Mitteilungen).

Eine Umfrage in allen US-Bundesstaaten, ob staatliche Regulierungsmaßnahmen für die Reptilienhaltung existieren, ergab in drei Staaten Informationszwang für den Händler über das Salmonellenrisiko bei Kunden, die Schildkröten kaufen wollen, in zwei Staaten das Gleiche beim Kauf irgendeines Reptils, und in drei Staaten ist die Reptilienhaltung in Kindertagesstätten u.ä. verboten (ANONYMUS, 1999).

Nach dem Zertifizierungsprogramm versuchte die Schildkrötenindustrie zunächst, das Verkaufsverbot von Schildkröten zu umgehen, indem embryonierte, fast schlupffreie Eier verkauft und exportiert wurden (D'AOUST et al., 1990). Zur Sanierung salmonelleninfizierter Schildkröten wurden verschiedene Ansätze unternommen: Durch Behandlung des Wassers von adulten Zuchtschildkröten mit Kupfersulfat erreichte man zwar eine stark reduzierte fäkale Salmonellenausscheidung, jedoch die unter diesen Bedingungen gelegten Eier und daraus geschlüpften Jungtiere waren signifikant häufiger mit Salmonellen kontaminiert als Vergleichsgruppen (KAUFMANN et al., 1972). Einige Autoren propagierten, dass Salmonellen-



freiheit erreicht werden kann, indem man die Schlüpflinge für eine gewisse Zeit in frischem, fließenden Wasser hält (WILLIAMS & HELSDON, 1965; OTIS & BEHLER, 1973); dies erwies sich aber nicht als effektiv (BAKER et al., 1972; CLEGG & HEATH 1975). Versuche, durch antibiotische Behandlung der Schildkröten die Salmonellen zu beseitigen, erbrachten zwar eine Verminderung der fäkalen Ausscheidung, konnten aber die systemische Infektion nicht beseitigen; nach unbestimmter Zeit werden wieder Salmonellen ausgeschieden (SIEBELING et al., 1975a; MERMIN et al., 1997). Auch die Trockenhaltung von Wasserschildkröten, die täglich nur 30 Minuten zur Nahrungsaufnahme ins Wasser gesetzt wurden, wurde untersucht; sie konnte ebenfalls die Salmonellenausscheidung nicht beenden (DU PONTE et al., 1978) und ist außerdem nicht tiergerecht (MCKIBBEN et al., 1978). Schließlich scheint nun die Behandlung von frisch gelegten, höchstens zwei Tage alten Eiern nach Reinigung der Schale in einem Antibiotikumtauchbad – ähnlich wie bei Geflügeleiern – und Ausbrüten in sterilen Behältnissen ohne Polstermaterial erfolgversprechend (SIEBELING et al., 1975b; MICHAEL-MARLER et al., 1983; SIEBELING et al., 1984), jedoch birgt diese Methode das Risiko der Ausbreitung von Resistenzen und somit eine noch größere Gesundheitsgefahr für den Menschen in sich. Bei D'AOUST et al. (1990) sind 81 % der aus Schildkröten aus Zuchtfarmen isolierten Salmonellenstämme resistent gegen Gentamicin.

Im Übrigen stellt sich die Sanierung von Salmonellenausscheidern als schwierig dar, die völlige Tilgung von Salmonellen ist keine realistische Zielsetzung (STELLMACHER & SCHÖLL, 1980). Die antibiotische Behandlung gesunder, salmonellenpositiver Reptilien, die zwar von manchen Autoren beschrieben wird, sollte vermieden werden, da sich die Ausscheidungsdauer dadurch eher verlängert (HRÚZIK, 1983) und höchstens eine momentane Salmonellenfreiheit erzielt werden kann, die Entstehung und Verbreitung von Resistenzen jedoch vorangetrieben wird (MERMIN et al., 1997; WOODWARD et al. 1997).

Da aus den genannten Gründen weder bei Schildkröten noch bei anderen Reptilien Salmonellenfreiheit erreicht oder garantiert werden kann, wurde vorgeschlagen, alle salmonellenpositiven Tiere besser zu töten als zu behandeln; dies ist aber nicht praktikabel. Gewöhnlich reichen gute Kenntnisse über geeignete Hygienemaßnahmen aus (CHIODINI & SUNDBERG, 1981). Deshalb ist es von immenser Bedeutung, Reptilienbesitzer und -käufer über das Salmonellenproblem zu informieren. Bei einer Umfrage wussten viele Reptilienhalter und auch -händler nicht, dass ihre Tiere eine mögliche Quelle für Salmonelleninfektionen sind. Darum sind Ärzte und Tierärzte angehalten, ihre Patienten auf diese Möglichkeit hinzuweisen (WEBER &



PIETZSCH, 1974; SCHRÖDER, 1985; SCHRÖDER, 1990; MERMIN et al., 1997; WOODWARD et al., 1997). Am besten sollten Interessenten gleich beim Kauf vom Händler gewarnt werden. In den USA wird eine Gesetzesinitiative zum Informationszwang der Kunden durch die Händler und evtl. ähnliche Verkaufsbeschränkungen wie bei Schildkröten für alle Reptilien vorgeschlagen (ANONYMUS, 1999). Laut DORRESTEIN et al. (2000) ist die Hauptursache für die starke Abnahme der Schildkröten-assoziierten Salmonellose nicht der durch Gesetz eingeschränkte Handel, sondern das verbesserte allgemeine Bewusstsein aufgrund von Informationen in Zeitung, Fernsehen, Radio und Internet; während die Öffentlichkeit über die Zusammenhänge zwischen Schildkröten und Salmonellose gut Bescheid weiß, sind sie ihr zwischen Grünen Leguanen und Salmonellose weniger bekannt.

Die beste Methode, sich und andere Haustiere vor einer durch Reptilien übertragenen Salmonellose zu schützen, ist angemessene Hygiene im eigenen Haushalt. Als Vorsichtsmaßnahmen werden empfohlen (WILLIAMS & HELSDON, 1965; ANONYMUS, 1981; WOODWARD et al., 1997; ANONYMUS, 1999; DORRESTEIN et al., 2000):

- nach jedem Kontakt mit Reptilien, dem Terrarium oder Einrichtungsgegenständen daraus oder mit dem Bassinwasser gründliches Händewaschen mit Wasser und Seife
- nicht essen, trinken und rauchen während Kontakt mit Reptilien, Käfigreinigung oder Wasserwechsel
- Pflege der Reptilien im Haushalt möglichst nur durch eine Person; diese sollte so verantwortungsbewusst sein, dass sie die Hygienepflicht erfüllt; es sollte demnach kein Kind sein
- Entleerung des Bassinwassers und Spülen von Futternäpfen usw. nicht im Küchenspülbecken, überhaupt Vermeidung der Kontamination von Küche und anderen Räumen, in denen Speisen zubereitet oder verzehrt werden
- Reptilien nicht in Waschbecken, Spüle oder Dusche baden oder waschen
- Reptilien im Käfig halten, kein Freilaufenlassen der Reptilien in der Wohnung, schon gar nicht in der Küche

Normalerweise geschieht eine Salmonelleninfektion oral über kontaminierte Nahrungsmittel, nur selten direkt von Tier zu Mensch. Dieser Infektionsweg herrscht bei kleinen Kindern in der oralen Phase vor, die ihre Schildkröten wie Spielzeug behandeln. Gleichzeitig bilden Kinder die Risikogruppe, die am stärksten durch eine Salmonelleninfektion gefährdet ist (WIL-



LIAMS & HELSDON, 1965; KAUFMANN, 1966; WEBER & PIETZSCH, 1974; DESSI et al., 1992; SANYAL et al., 1997; DORRESTEIN et al., 2000). Deshalb wird Familien mit Kindern unter fünf Jahren von der Reptilienhaltung überhaupt abgeraten; sie sollten abwägen, ob die Freude, solche Tiere zu besitzen, das Gesundheitsrisiko wert ist, das sie mit sich bringen (ACKMAN et al., 1995; DALTON et al., 1995; SANYAL et al., 1997; ANONYMUS, 1999). GILJAHN & HALPIN (1988) bezeichnen Reptilien als ungeeignete Haustiere für Kinder, da sie auch noch andere Krankheitserreger übertragen können (MCCOY & SEIDLER, 1973; WEIL et al., 1995; DORRESTEIN et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Reptilien, die als Heimtier gehalten werden, ist die Übertragung von Salmonellen durch Zooreptilien auf den Menschen normalerweise relativ selten. Die Besucher haben kaum Kontakt mit ihnen, und das Personal ist gut geschult und informiert, um eine Infektion zu vermeiden (RUDAT et al., 1966; LIE, 1968; SELBITZ & ENGELMANN, 1984; SCHRÖDER, 1990). Doch auch hier wird von einem Fall berichtet, bei dem sich mehrere Besucher einer Reptilienausstellung durch direkten oder indirekten Kontakt mit einem Komodowaran, *Varanus komodensis*, mit Salmonellen infizierten (SANGALINE & SNIDER, 1997). In Zoos gilt es hauptsächlich, durch hygienische Maßnahmen die Keimübertragung von salmonellenpositiven auf salmonellenegative Tiere zu verhindern, und besonders eine Infektion der sehr viel empfänglicheren Säugetiere mit Reptiliensalmonellen zu vermeiden. Deshalb sollten Reptilien nicht in einem Gehege mit Säugern gehalten werden (LIE, 1968; JACKSON & JACKSON, 1971). Tiere, bei denen die Salmonellenausscheidung bekannt ist, sollten nicht mit salmonellenfreien Tieren vergesellschaftet werden. Pflegepersonal sollte möglichst nicht getauscht werden (LIE, 1968). Bei Neueinstellungen sollte eine gewisse Quarantäne eingehalten und mehrere – bis zu zehn – Kotproben untersucht werden, da ein einmal negatives Ergebnis nicht aussagekräftig ist und auch Reinfektionen durch Koprophagie möglich sind (PRUKSARAJ, 1967; ALTMANN & ALTMANN, 1977; IPPEN & SCHRÖDER, 1977; SELBITZ et al., 1984; SELBITZ, 1986; WORREL, 1999); nicht einmal mehrfach negative Proben beweisen die Salmonellenfreiheit, intermittierende Ausscheidung mit monatelangen Pausen und erneute Keimausscheidung nach langer Zeit auch ohne Reinfektion kann vorkommen (KAUFMANN et al., 1972; CLEGG & HEATH, 1975; SCHRÖDER, 1985).

Im Gegensatz zu der heute vertretenen Ansicht wird in der älteren Literatur die Sanierung salmonellenpositiver Tiere durch eine Antibiotikatherapie für möglich gehalten (WEBER & PIETZSCH, 1974; ALTMANN & ALTMANN, 1977); laut SCHRÖDER (1985) ist sie schon



im Rahmen des Gesundheitsschutzes des Menschen erforderlich. Doch der bloße Nachweis von Salmonellen ist keine Indikation für eine antibiotische Behandlung; diese sollte nur bei ernststen Erkrankungen unter Berücksichtigung des Wertes des Tieres und nach strenger Beurteilung der Behandlungswürdigkeit wie Kooperationsbereitschaft des Besitzers und Haltungsbedingungen vorgenommen werden (SCHRÖDER, 1970; SELBITZ & ENGELMANN, 1984; WEIL et al., 1995; SUEDERMEYER 1999; DORRESTEIN et al., 2000).

Personen, die ständigen Kontakt zu Reptilien haben, sollten sich auch ohne klinischen Verdacht einmal jährlich auf Salmonellen untersuchen lassen (LIE, 1968; SCHRÖDER, 1970; SCHRÖDER 1990).

## **2.2 SALMONELLENANZUCHT UND -NACHWEIS**

### **2.2.1 Verfahren für den Salmonellennachweis**

#### **2.2.1.1 Kulturell-biochemische Methoden**

##### **Prinzip**

Salmonellen sind – in der Regel – laktosenegativ, das bedeutet, dass sie nicht die Fähigkeit besitzen, Laktose zu spalten. Viele andere Bakterien dagegen, die oft zusammen mit Salmonellen im gleichen Untersuchungsgut vorkommen, können Laktose spalten; sie sind laktosepositiv. Laktosenegative Kulturen gelten als salmonellenverdächtig; bei der weiteren biochemischen und serologischen Differenzierung kann der Verdacht entweder bestätigt werden, und die Bakterien erweisen sich tatsächlich als Salmonellen, oder die verdächtigen Kolonien werden als andere laktosenegative Bakterien identifiziert. Für die biochemische Differenzierung und Identifizierung werden Reaktionen genutzt, die auf der Enzymausstattung der Mikroorganismen beruhen (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; BOCKEMÜHL, 1992). Es gibt vielerlei Tests, anhand derer ein Mikroorganismus mehr oder weniger eindeutig einer Familie, Gattung oder Spezies zugeordnet werden kann. Kommerziell erhältlich sind heute sogenannte „Bunte Reihen“, Minitestsysteme, bei deren Aus-



wertung man einen numerischen Code erhält, mit dem man nach einem bestimmten Schlüssel das Bakterium identifizieren kann (BOCKEMÜHL, 1992; REISSBRODT, 1995). Durch weitere Untersuchungen wie z.B. Serotypisierung oder Lysotypisierung können einzelne Stämme noch genauer bestimmt werden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BLOBEL & SCHLIESSER, 1981; BOCKEMÜHL, 1992).

Grundlage für jede Differenzierung ist jedoch die Anzüchtung und weiter die Separation und Isolation von verdächtigen Einzelkolonien oder Reinkulturen. Dazu bedient man sich sogenannter Selektiv- und Differenzierungsnährböden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BOCKEMÜHL, 1992; REISSBRODT, 1995).

### **Selektiv- und Differenzierungsmedien**

Ihr Prinzip beruht darauf, dass Begleitkeime durch geeignete Zusätze in ihrer Entwicklung gehemmt werden, während sich Salmonellen gut vermehren können. Aufgrund von Stoffumsatz beim Wachstum sich ergebende pH-Wert-Änderungen werden durch bestimmte Farbreaktionen zugegebener Indikatoren angezeigt. Im Handel sind viele verschiedene Salmonellen-Selektiv- und Differenzierungsnährböden mit unterschiedlich starker Hemmung der Begleitflora erhältlich.

Die meisten Differenzierungsnährböden für Salmonellen beruhen auf Laktosespaltung, sogenannte Laktose-Indikatorplatten (HALLMANN & BURKHARDT, 1974). Probleme bei der Salmonellendiagnostik ergeben sich bei laktosepositiven Salmonellen (BLACKBURN & ELLIS, 1973), die vor allem in der Subspezies IIIa und b (BOCKEMÜHL, 1992; ROLLE & MAYR, 1993; REISSBRODT, 1995), vereinzelt aber auch in den Subspezies I (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; RUIZ et al., 1996) und IV (REISSBRODT, 1995) vorkommen; von ursprünglich laktosenegativen Salmonellenstämmen kann die Fähigkeit zur Laktosespaltung durch Plasmide erworben werden (BOCKEMÜHL, 1992). Derartige Kolonien erscheinen unverdächtig und werden bei Routineuntersuchungen übersehen. Bei Verdacht auf Anwesenheit solcher Salmonellen, wie es gerade im Untersuchungsgut von Reptilien häufig der Fall ist, sollten Nährböden mitverwendet werden, die H<sub>2</sub>S-Bildung anzeigen (ROLLE & MAYR, 1993). Die H<sub>2</sub>S-Bildung kann jedoch bei einigen Stämmen fehlen oder nur schwach ausgebildet sein (BLACKBURN & ELLIS, 1973; BOCKEMÜHL, 1992).

Je nach Stärke der Hemmung der Selektivmedien wird die Begleitflora mehr oder weniger stark unterdrückt. Bei starker Hemmung ist es möglich, dass auch einige empfindlichere Sal-



monellenstämme gehemmt werden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BOCKEMÜHL, 1992). Bei weniger starker Hemmung dagegen kann es passieren, dass eventuell reichlich vorhandene Begleitflora gut gedeiht und Salmonellenkolonien überwuchert, so dass diese nicht mehr erkannt, isoliert und identifiziert werden können.

Der Art des Untersuchungsmaterials entsprechend sollten geeignete Nährmedien gewählt werden, z.B. stärker hemmende Nährböden für Fäzesproben oder Rektalabstriche, bei denen mit viel Begleitflora gerechnet werden muss; bei klinischem Material wie z.B. Blut oder bei Lebensmittelproben, in denen generell weniger Begleitflora vorhanden ist, können schwächer selektive Nährböden eingesetzt werden (BOCKEMÜHL, 1992). Auch die Art des erwarteten Erregers beeinflusst die Nährbodenauswahl; beispielsweise können *S. Typhi* auf bestimmten Nährböden nicht, *S. Gallinarumpullorum*, *S. Abortusequi* und *S. Abortusovis* erst nach verlängerter Bebrütung nachgewiesen werden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; ROLLE & MAYR, 1993).

Die Beimpfung nur eines einzigen Nährbodens ist unzureichend; es sollte stets eine Kombination von zwei, besser drei Nährmedien mit unterschiedlicher Selektivitätswirkung verwendet werden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; STELLMACHER & BIEWALD, 1987; BOCKEMÜHL, 1992).

Bewährt hat sich der Einsatz flüssiger Selektivanreicherungsmedien, in die geringe Mengen des Untersuchungsgutes eingepflegt werden. Aus diesen wird nach einer gewissen Bebrütungsdauer auf feste Selektiv- und Differenzierungsmedien ausgestrichen (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; BOCKEMÜHL, 1992; REISSBRODT, 1995). Für subletal geschädigte Salmonellen, z.B. in erhitzten, gefrorenen oder gesäuerten Lebens- oder Futtermitteln o.ä., aber auch in älteren, eventuell eingetrockneten klinischen Proben, Fäzes oder Rektalabstrichen kann eine Voranreicherung in nicht selektiven, flüssigen Nährmedien sinnvoll sein (ROLLE & MAYR, 1993; REISSBRODT, 1995).

### **Kosten-Nutzen-Verhältnis**

Beim Salmonellennachweis ist das Verhältnis der nachgewiesenen und identifizierten Salmonellenstämme zu dem im Labor für die Untersuchungen geleisteten Zeit- und Kostenaufwand zu beachten. Bei Verwendung mehrerer flüssiger und fester Nährmedien, bei häufigem Ausstrich und bei Überprüfung einer großen Anzahl verdächtiger Kolonien können unter Umständen Salmonellen in Proben nachgewiesen werden, die sonst als salmonellenfrei eingestuft



würden. Alle Autoren sind sich einig, dass am häufigsten salmonellenpositive Proben erkannt werden können, wenn mehrere Anreicherungen und Ausstriche angelegt werden (SHARMA & PACKER, 1969; IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1972). Trotz der Bemühung, möglichst alle mit Salmonellen behafteten Proben zu erkennen, müssen jedoch Materialkosten im Labor und Arbeitsaufwand berücksichtigt werden (HALLMANN & BURKHARDT, 1974; LIEBER, 1982).

### **2.2.1.2 Andere Nachweismethoden**

Neben den konventionellen kulturellen Methoden sind andere Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Salmonellen entwickelt worden, z.B. Impedanzmessungen, ELISA-Techniken, DNA-Sonden, PCR-Nachweis und immunologische Methoden. In Deutschland dürfen diese Methoden bei der Lebensmitteluntersuchung zur Verdachtsdiagnose eingesetzt werden. Die Bestätigung muss aber kulturell nach den Vorschriften des § 35 des LMBG (Lebensmittelbedarfsgegenständegesetz) erfolgen (REISSBRODT, 1995; L 00.00-20, 1998; L 00.00-66, 2002; L 00.00-67, 2002).

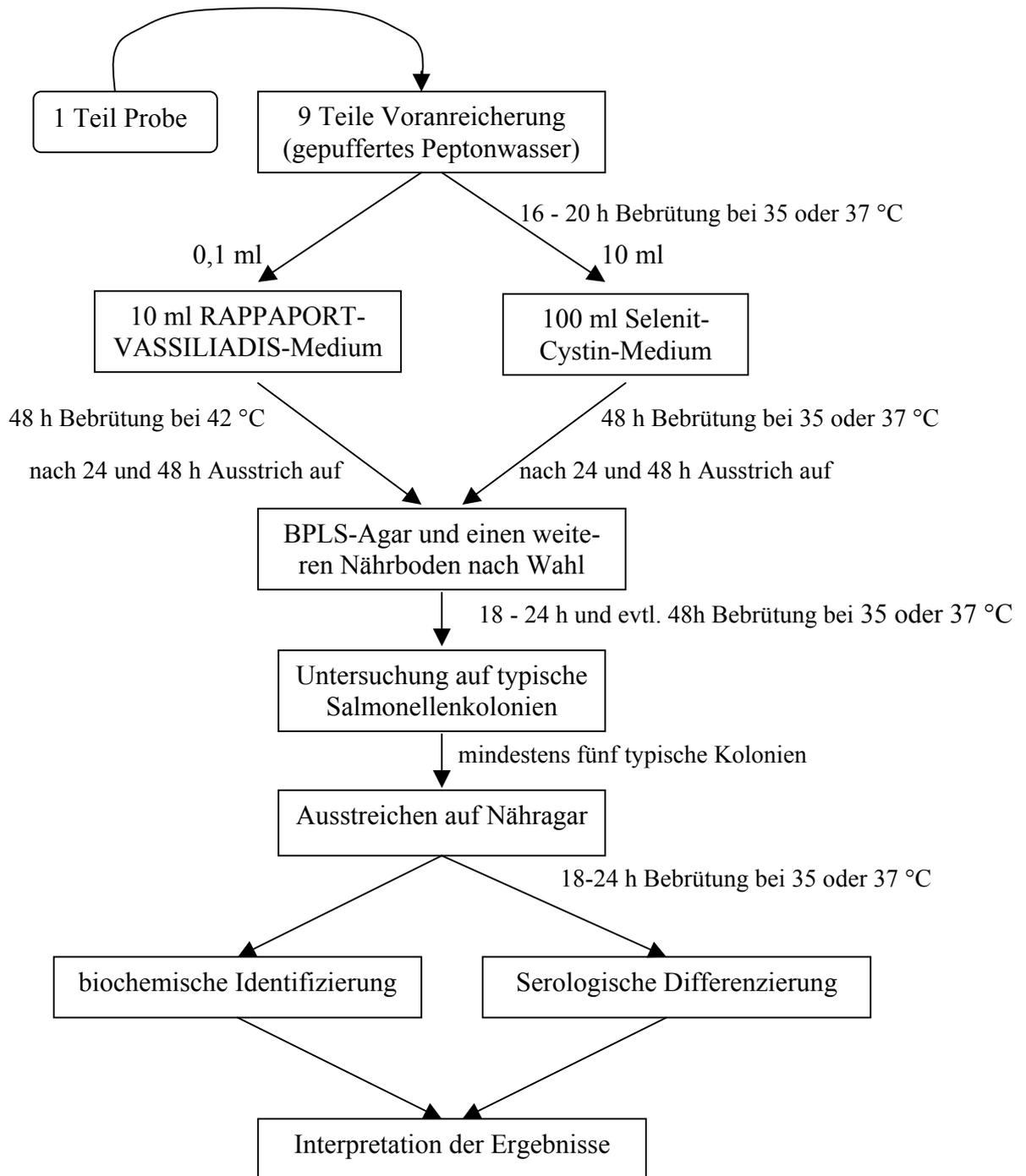
## **2.2.2 Empfehlungen für den Salmonellennachweis**

### **2.2.2.1 Nach § 35 LMBG**

In § 35 des LMBG wird darauf hingewiesen, dass für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln die Empfehlungen der Amtlichen Sammlung L 00.00-20 (1998) angewendet werden sollten. In dieser sind genaue Anweisungen für den Salmonellennachweis niedergelegt. In Abbildung 2 wird dieser Untersuchungsgang kurz beschrieben.

### **2.2.2.2 Sonstige Empfehlungen**

Für die Stuhluntersuchung des Menschen auf Salmonellen existieren DIN-Empfehlungen (DIN 58942-5, 1995) und Qualitätsstandards in der mikrobiologisch- infektiologischen Diagnostik für Infektionen des Darmes (MIQ 9) (KIST et al., 2000), auf die im ISG



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Salmonellennachweises nach den Empfehlungen der Amtlichen Sammlung L 00.00-20 (1998) nach § 35 LMBG

**Abkürzungen:** BPLS: Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar; h: Stunden



(Infektionsschutzgesetz) hingewiesen wird. Nach den DIN-Empfehlungen sollen zwei flüssige Anreicherungsmedien eingesetzt werden, genannt werden Selenit- und Tetrathionatbouillon. Für den Direktausstrich werden als Kulturmedien mit mittlerem Selektivitätsgrad Desoxycholat-Zitrat- (DC) und Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD), mit hohem Selektivitätsgrad Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose- (BPLS) und Salmonella-Shigella-Agar (SS) vorgeschlagen. Selektivmedien für den Ausstrich aus der Anreicherung sind XLD-, BPLS-, MacConkey- und RAMBACH-Agar. Es ist anzustreben, aus der Anreicherung auf drei verschiedenen Nährböden auszustreichen. Nach den MIQ 9 (KIST et al., 2000) sollen im Direktausstrich Nährböden mit geringem Selektivitätsgrad wie MacConkey- und RAMBACH-Agar und mit mittlerem Selektivitätsgrad wie XLD- und DC-Agar kombiniert werden. Die Anreicherung erfolgt in Selenit- und Tetrathionat-Bouillon bei 37 °C oder, wenn keine Typhuserreger berücksichtigt werden müssen, ausschließlich in Tetrathionat- oder RAPPAPORT-VASSILIADIS-Bouillon bei 37 bzw. 42 °C. Zur Subkultur werden Nährböden mit hohem Selektivitätsgrad wie Wismutsulfit- und BPLS-Agar in Kombination mit weniger selektiven Indikatornährböden wie XLD- oder RAMBACH-Agar empfohlen.

Der Nachweis von Salmonellen aus homoiothermen Tieren stützt sich ebenfalls auf diese Empfehlungen. Spezielle Untersuchungsanweisungen für den Salmonellennachweis bei Tieren gibt es nicht. Dementsprechend existieren auch keine Empfehlungen für Reptilien.

Im Folgenden ist eine Zusammenstellung der Isolierungs- und Nachweisverfahren von Salmonellen bei Reptilien in der Literatur gegeben (Tab. 6 und 7). Darin wird die Variabilität der angewendeten Anzucht- und Isolierungsmethoden deutlich, was einen Hinweis darauf gibt, dass etablierte Verfahren für den Nachweis von Salmonellen aus Reptilien nicht ausreichend und zuverlässig sind (MADSEN, 1994).

In diesen beiden Tabellen sieht man, wie unterschiedlich die Salmonellenanzucht und weitere Differenzierung salmonellenverdächtiger Kolonien bei der Untersuchung von Reptilien gehandhabt wird. Manche Autoren streichen nur auf einem einzigen Nährboden aus (DIMOW et al., 1961; KALVIG et al., 1991; BURNHAM et al., 1999), andere verwenden drei oder vier (LAMM et al., 1972; ONDERKA & FINLAYSON, 1985). In einigen Untersuchungen wird keine Selektivanreicherung durchgeführt (ROGGENDORF & MÜLLER, 1976; ORÓS et al., 1996), in anderen sogar eine Zwei- und Dreifachanreicherung (SIEBELING et al., 1975a; WUTHE et al., 1979; FRICK, 1987; GEUE & LÖSCHNER, 2002). Auch die Wahl der



Tab. 6: Verschiedene Verfahren der Salmonellenzucht aus Reptilien

| Direktausstrich/<br>Voranreicherung               | Anreicherungs-<br>medium/-schritte  | Anreicherungs-<br>temperatur/-dauer | Subkultur auf             | Autor                         |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| -   | Selenit, Nähr-B                     | -                                   | Leifson, WS               | BOYCOTT et al.,<br>1953       |
| Leifson   | T                                   | -                                   | Endo                      | KIESEWALTER et<br>al., 1960   |
| Gassner   | T                                   | 37 °C; 24 und 72 h                  | Gassner                   | DIMOW et al., 1961            |
| -   | Selenit                             | 18-24 h                             | Leifson, SS               | LIE, 1968                     |
| SS, WS  | Leifson, Selenit F,<br>RV, 2 neue   | 37 °C; 18-24, evtl.<br>48 h         | SS, WS                    | IVESON, 1969                  |
| Leifson, BG-<br>MacConkey                         | Selenit F                           | 37 °C; 1 und 5 d                    | Leifson, BG-<br>MacConkey | JEPHCOTT et al.,<br>1969      |
| Gassner,<br>Phenolrot                             | -                                   | -                                   | -                         | SCHRÖDER, 1970                |
| BG, MacConkey                                     | Selenit F                           | 42°C; 18-20 h                       | BG,<br>MacConkey          | DE HAMEL et al.,<br>1971      |
| -   | Selenit F                           | 20 - 35 °C; 18-38 h                 | Leifson                   | JACKSON &<br>JACKSON, 1971    |
| Laktose-B   | Selenit-Cystin                      | 35°C; 18-24 h                       | XLD, WS, SS               | LAMM et al., 1972             |
| -   | MKT, Selenit F                      | 48 h                                | Endo, Leifson             | ANG et al., 1973              |
| -   | T                                   | 43 °C;<br>18-24 und 48 h            | „Pril“-Gassner,<br>BPLS   | HABERMALZ &<br>PIETZSCH, 1973 |
| -   | T, Selenit                          | 37 und 43<br>bzw. 37 °C             | BG                        | KOOPMAN &<br>JANSSEN, 1973    |
| Transportmedium                                   | max. 24 h                           |                                     | EMB, HE                   | OTIS et al, 1973              |
| -   | TBG                                 | 37 °C; 48 h                         | BG-Sulfa                  | WELLS et al., 1974            |
| -   | Selenit, R                          | 37 <b>und</b> 43 °C;<br>über Nacht  | BPLS                      | CLEGG & HEATH,<br>1975        |
| zusätzl. Laktose-<br>B, 37 °C 24 h                | TBG <sup>1</sup>                    | 37 °C; 48 h                         | BG-Sulfa, WS              | SIEBELING et al.,<br>1975a    |
| -   | Selenit-Cystin,<br>TBG <sup>1</sup> | 37 °C; 48 h                         | BG-Sulfa, WS              | SIEBELING et al.,<br>1975b    |
| Blutagar, McCon-<br>key, Endo, Phe-<br>nolrot, SS | -                                   | -                                   | -                         | ROGGENDORF &<br>MÜLLER, 1976  |
| Peptonwasser;<br>Endo, SS                         | T <sup>2</sup>                      | 37 °C; 18 h                         | Endo, SS                  | WUTHE et al., 1979            |
| HE, MacConkey                                     | GN-Broth                            | 35 °C; 18 h                         | HE                        | CAMBRE et al., 1980           |
| z.T. Laktose-B;<br>37 °C 24 h                     | T                                   | 37 °C, 48 h                         | BG-Sulfa, WS              | MICHAEL-MARLER<br>et al, 1982 |
| Gassner   | T                                   | 24 und 48 h                         | BGP, Gassner              | SELBITZ et al., 1984          |
| -   | Selenit;<br><b>anschließend R</b>   | 42 °C bzw. 37 °C,<br>18 h           | BG, HE, WS,<br>MacConkey  | ONDERKA &<br>FINLAYSON, 1985  |
| -   | T, Selenit-Cystin                   | 37 °C; 48 h                         | BG-Sulfa, WS              | SIEBELING et al.,<br>1985     |
| kurze Peptonan-<br>reich., Endo, SS               | T; evtl. <sup>3</sup>               | 18 h                                | Endo, SS                  | FRICK, 1987                   |
| Nähr-B; 35 °C,<br>16-18 h                         | Selenit-Cystin,<br>TBG              | 43 bzw. 35 °C; 16-<br>18 h          | BG-Sulfa, WS              | D'AOUST et al., 1990          |

**Fortsetzung Tab. 6:** *Verschiedene Verfahren der Salmonellenanzucht aus Reptilien*

| Direktausstrich/<br>Voranreicherung        | Anreicherungs-<br>medium/-Schritte | Anreicherungs-<br>temperatur/-Dauer | Subkultur auf           | Autor                      |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| (z.T.) Gassner,<br>Phenolrot               | (z.T.) T                           | 37 °C; 24 h                         | Gassner, Phe-<br>nolrot | SCHRÖDER, 1990             |
| -  | GN                                 | 18 h                                | HE                      | KALVIG et al., 1991        |
| MacConkey,<br>Blutagar, Colum-<br>bia, XLD | -                                  | -                                   | -                       | ORÓS et al., 1996          |
| -  | T                                  | 37 °C; 18-24 h                      | SS                      | BURNHAM et al.,<br>1999    |
| unklare Angabe                             | Serum-B., T                        | -                                   | Pferdeblutagar,<br>BG   | DORRESTEIN et al.,<br>2000 |
| -  | Selenit                            | 37 °C; 24 h                         | keine Angabe            | MITCHELL et al.,<br>2000   |
| Peptonwasser,<br>37 °C 16-24 h             | RV, TBG; <sup>3</sup>              | 42 bzw. 37 °C;<br>16-24 h           | BPLS, XLD               | GEUE &<br>LÖSCHNER, 2002   |

**Abkürzungen:** B: Bouillon; BG: Brillantgrün-A(gar); BGP: Brillantgrün-Phenolrot-A.; BPLS: Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-A; EMB: Eosin-Methylenblau-Laktose-Saccharose-A; GN: Gram-Negative; h: Stunden; HE: Hektoen-Entero-A; MKT: Müller-Kauffmann-Tetrathionat; R: RAPPAPORT; RV: RAPPAPORT-VASSILIADIS; SS: Salmonella-Shigella-A; Sulfa: Sulfadiazin; T: Tetrathionat; TBG: Tetrathionat-Brillantgrün; WS: Wismutsulfit-A; XLD: Xylose-Lysin-Desoxycholat-A; <sup>1</sup>: 2-Fachanreicherung in TBG nach 7 Tagen, wenn Ergebnis negativ war; <sup>2</sup>: 2-Fachanreicherung; <sup>3</sup>: 2- und 3-Fachanreicherung; -: nicht durchgeführt bzw. keine Angaben

eingesetzten flüssigen und festen Nährmedien ist sehr variabel, ebenso die Bebrütungstemperatur für die flüssigen Selektivmedien; JACKSON & JACKSON (1971), LAMM et al. (1972) und CAMBRE et al. (1980) z.B. bebrüten bei relativ niedrigen Temperaturen bis 35 °C, CLEGG & HEATH (1975), ONDERKA & FINLAYSON (1985), D'AOUST et al. (1990) und GEUE & LÖSCHNER (2002) beispielsweise wählen Temperaturen bis 43 °C. Bei der weiteren Differenzierung (Tab. 7) fällt auf, dass in vielen Fällen nur laktosenegative Kolonien Salmonellenverdacht erregen (JEPHCOTT et al., 1969; SCHRÖDER, 1970; KOOPMAN & JANSSEN, 1973; WELLS et al., 1974; CLEGG & HEATH, 1975; CAMBRE et al., 1980; ORÓS et al., 1996); einige Untersucher differenzieren aber auch laktosepositive (HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; FRICK, 1987) oder anderweitig verdächtige Kolonien, z.B. H<sub>2</sub>S-positive oder Lysin spaltende (SIEBELING et al., 1975a; WUTHE et al., 1979) weiter aus.

ROGGENDORF & MÜLLER (1976) identifizieren alle Einzelkolonien, wobei darauf hingewiesen wird, dass diese Autoren die Fäkalflora bei Reptilien studieren und keine gezielten Untersuchungen auf Salmonellen durchführen. Die Anzahl der weiteruntersuchten Kolonien

**Tab.7:** *Verschiedene Verfahren der weiteren Differenzierung von salmonellenverdächtigen Kolonien aus Reptilien*

| <b>weitere Differenzierung</b>   | <b>Autor</b>               |
|--|----------------------------|
| 15 K von jeder Platte, mindestens eine von jeder Art   | BOYCOTT et al., 1953       |
| verdächtige K probeagglutiniert., biochemische Vorprüfung., dann serolog. und biochem.   | KIESEWALTER et al., 1960   |
| verdächtige K serolog. und biochem.  | DIMOW et al., 1961         |
| verdächtige K auf Dreizucker-Agar nach Kligler, mod. mit Harnstoff; Serologie  | LIE, 1968                  |
| laktoseneg. K auf SS oder verdächtige K auf WS biochem.  | IVESON, 1969               |
| laktoseneg. K serolog. und biochem.  | JEPHCOTT et al., 1969      |
| nur laktoseneg. K  | SCHRÖDER, 1970             |
| verdächtige K auf Eisen-Dreizucker- und Harnstoff-Agar, dann serolog.  | DE HAMEL et al., 1971      |
| verdächtige K auf Kliglers Eisen-Agar, dann biochemisches Screening und Serologie  | JACKSON & JACKSON, 1971    |
| verdächtige K auf Eisen-Dreizucker-Agar, dann biochem. und serolog.  | LAMM et al., 1972          |
| biochem. und serolog.  | ANG et al., 1973           |
| mehrere verschiedene laktosepos. und -neg. Einzelkolonien serolog.   | HABERMALZ & PIETZSCH, 1973 |
| nur laktoseneg. K  | KOOPMAN & JANSSEN, 1973    |
| verdächtige K biochemisch vorgeprüft, dann serolog.  | OTIS et al, 1973           |
| 3 laktoseneg. K biochem. und serolog.  | WELLS et al., 1974         |
| nur laktoseneg. K serolog.   | CLEGG & HEATH, 1975        |
| 3 laktoseneg. (BG-Sulfa) und 3 schwarze (WS) K biochem. und serolog.   | SIEBELING et al., 1975a    |
| wie SIEBELING et al. 1975a   | SIEBELING et al., 1975b    |
| alle Einzelkolonien biochem. (studieren Fäkalflora)  | ROGGENDORF & MÜLLER, 1976  |
| laktosepos. und -neg. K auf Lysin-Eisen-Agar; verdächtige K (H <sub>2</sub> S- und lysindecarboxylasepos.) biochem. und serolog.; bis zu 150/Probe | WUTHE et al., 1979         |
| laktoseneg. K auf Eisen-Dreizucker-Agar; alle H <sub>2</sub> S- Bilder und laktose-neg. K biochem., dann serolog.                                  | CAMBRE et al., 1980        |
| wie SIEBELING et al., 1975   | MICHAEL-MARLER et al, 1982 |
| biochem. und serolog.  | ONDERKA & FINLAYSON, 1985  |
| wie SIEBELING et al., 1975   | SIEBELING et al., 1985     |
| laktosepos. und -neg. K auf Lysin-Eisen-Agar; mindestens 50/Platte   | FRICK, 1987                |
| verdächtige K auf Eisen-Dreizucker- und Lysin-Eisen-Agar, dann serolog.  | D'AOUST et al, 1990        |
| biochem.   | SCHRÖDER, 1990             |
| biochem., z.T. serolog.  | KALVIG et al., 1991        |
| laktoseneg. K biochemisch  | ORÓS et al., 1996          |
| verdächtige K auf Schrägagar; biochem., dann serolog.  | BURNHAM et al., 1999       |
| Indolmedium, Eisen-Dreizucker-Agar und Harnstoffbouillon; seit 1980 API; anschließend serolog.   | DORRESTEIN et al., 2000    |
| 3 verdächtige K pro Platte serolog.  | GEUE & LÖSCHNER, 2002      |

**Abkürzungen:** BG-Sulfa: Brillantgrün-Sulfadiazin-Agar; biochem.: biochemisch bestimmt; K: Kolonien; mod.: modifiziert; neg.: negativ; pos.: positiv; serolog.: serologisch bestimmt; SS: Salmonella-Shigella-Agar; WS: Wismut-sulfit-Agar



pro Nährbodenplatte reicht von drei (WELLS et al., 1974; SIEBELING et al., 1975a; GEUE & LÖSCHNER, 2002) über 15 (BOYCOTT et al., 1953) bis zu 50 (FRICK, 1987). Die Wahl der GN-Bouillon (Gram-Negativ) als Anreicherungsmedium begründen CAMBRE et al. (1980) damit, dass Tetrathionat- und Selenit F-Anreicherung für *S. Choleraesuis* und einige *S. Enteritidis*-Stämme toxisch ist und auch einige Arizonakeime damit nicht gefunden werden können. Aus dem gleichen Grund verwenden sie HE-Agar (Hektoen-Enter). WUTHE et al. (1979) erklären die hohe Salmonelleninzidenz bei freilebenden Schlangen in Norddeutschland in ihrer Untersuchung (siehe Tab. 4, S. 26) mit der durchgeführten Dreifachanreicherung und durch Überimpfen verdächtiger Kolonien auf Lysin-Eisen-Agar; dieser ist laktoseunabhängig und ermöglicht das zeit- und kostengünstige Screening einer großen Anzahl von Kolonien, obwohl selbst damit nicht alle Salmonellen erkannt werden können, da auch Lysin-decarboxylase- und H<sub>2</sub>S-negative Isolate unter den Salmonellen vorkommen. Trotz dieser Einschränkung betont auch FRICK (1987) die Vorteile dieses Nährbodens. Durch die mehrstufige Anreicherung erreichten WUTHE et al. (1979) eine erhebliche Mehrausbeute weiterer erstmalig positiver Befunde im Vergleich zur Voranreicherung bzw. einfacher Anreicherung. KOOPMAN & JANSSEN (1973) vergleichen drei verschiedene Anreicherungsmethoden für die Eignung in der Salmonellendiagnostik bei Reptilien: Selenit bei 37 °C und Tetrathionat bei 37 und 43 °C. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren bestehen, dass aber eine Kombination von zwei Methoden gegenüber nur einer eine Mehrausbeute von 38 % erbringt, eine Kombination von drei sogar 65 % mehr positive Proben entdeckt. Im folgenden Kapitel sollen die Hintergründe für die unterschiedlichen Anreicherungs- und Anzuchtverfahren etwas beleuchtet werden, insbesondere in Hinblick auf Bebrütungstemperatur und -dauer der flüssigen Selektivmedien und die Auswahl der Anreicherungs- und Differenzierungsmedien.

### **2.2.3 Salmonellen-Selektiv- und -Differenzierungsmedien**

Ein gutes Salmonellen-Selektivmedium soll die gesuchten Bakterien in ihrem Wachstum fördern, die Vermehrung von Begleitkeimen jedoch hemmen oder besser noch ganz unterdrücken. Die bakteriostatische oder bakterizide Wirkung des Inhibitors soll auf die Begleitflora möglichst groß, auf Salmonellen jedoch minimal sein, um die Wahrscheinlichkeit, Salmonel-



len isolieren zu können, zu steigern; dies ist umso wichtiger, wenn nur sehr wenige Salmonellen im Untersuchungsgut vorhanden sind. Dieses Prinzip gilt sowohl für flüssige als auch für feste Nährmedien (BANWART & AYRES, 1953; RAPPAPORT et al., 1956; JEFFRIES, 1959; IVESON, 1972). Die Eignung eines Selektivanreicherungsmediums ist nicht für jedes Probenmaterial gleich; sie hängt von den gesuchten Serovaren, den vorhandenen Begleitkeimen und den Inhaltsstoffen im Untersuchungsmaterial ab (BANWART & AYRES, 1953; GUINÉE et al., 1965); so muss bei der Untersuchung von Kot- oder Abwasserproben beispielsweise mit mehr Begleitkeimen gerechnet werden, die Salmonellen überwuchern und somit deren Isolation und Identifikation erschweren, als bei der Untersuchung von klinischem Material wie Blut oder Organen. Die Anzucht von z.B. *S. Typhi*, *S. Paratyphi B* oder *S. Choleraesuis* erfordert andere Bedingungen als die von vielen anderen Serovaren (HARVEY & PRICE, 1979). Manche Untersuchungsmaterialien wie z.B. Ei, Gelatine oder Fäzes können die hemmende Wirkung des Selektivmediums auf Salmonellen oder Begleitflora senken oder steigern (BANWART & AYRES, 1953; SILLIKER & TAYLOR, 1958; SILLIKER et al., 1964; VASSILIADIS et al., 1974). Im letzten Jahrhundert wurden viele Salmonellen-Selektivanreicherungsmedien entwickelt (MACCONKEY, 1908; LEIFSON, 1935; STOKES & OSBORNE, 1955; RAPPAPORT et al., 1956; HARVEY et al., 1979; STELLMACHER & BIEWALD, 1987); die meisten beruhen auf der Hemmung der Begleitflora durch Triphenylmethanfarbstoffe wie Malachitgrün und Brillantgrün oder Salzen von Gallensäuren wie Desoxycholat und Taurocholat. Später wurden vermehrt Antibiotika und Sulfonamide wie Novobiocin, Sulfadiazin, Sulfacetamid o.ä. zugesetzt (JEFFRIES, 1959; WATSON & WALKER, 1978; JONES et al., 1984; MILLER et al., 1991). Im Laufe der Zeit wurden die Medien immer wieder modifiziert und in ihrer Leistungsfähigkeit untereinander verglichen (BANWART & AYRES, 1953). Dabei fallen die Bewertungen für das gleiche Medium bei verschiedenen Untersuchungen oftmals ganz verschieden aus (COLLARD & UNWIN, 1958); Ursache dafür kann unterschiedliches Probenmaterial sein oder der Agar, auf dem die Anreicherung ausgestrichen wird; aber auch bei gleichem Probenmaterial können sich bei verschiedenen Untersuchern Unterschiede in der Effizienz ein und desselben Mediums ergeben (EDEL & KAMPELMACHER, 1969). Nach READ & REYES (1968) und HARVEY et al. (1975) bestehen gerade bei kommerziell erhältlichen Produkten große Unterschiede in der Effizienz verschiedener Sorten und Chargen eines Mediums, die z.T. auf inhomogener Verteilung des Hemmstoffes beruhen.



Es gibt kein Medium, das für die Anzucht aller Salmonellen aus allen Proben gleich gut geeignet ist (BANWART & AYRES, 1953; JEFFRIES, 1959; SNOEYENBOS & CARLSON, 1972; HARVEY & PRICE, 1976; RHODES & QUESNEL, 1986), jeder Untersucher muss aus der Fülle der vorhandenen Medien eines auswählen, das die Erfordernisse der jeweiligen Untersuchung am besten erfüllt. Spezielle Studien über die Anzucht von Arizonakeimen oder die Untersuchung von Kotproben von Reptilien gibt es nur wenige. Im Folgenden werden einige weitverbreitete Salmonellen-Selektiv- und -Differenzierungsmedien vorgestellt.

### 2.2.3.1 Flüssige Selektivanreicherungsmedien

Schon sehr lange ist bekannt, dass bei der Untersuchung einer Probe auf Salmonellen die Anzuchtung in einem flüssigen Medium gegenüber dem Direktausstrich auf einem Nährboden vorteilhaft ist. THOMSON (1955) und HARVEY & PRICE (1979) begründen dies damit, dass ein flüssiges Medium ein größeres Inokulum verträgt als ein fester Nährboden. MCCOY (1962) vertritt dabei die Meinung, dass eine selektive Anreicherung nicht notwendig ist, sondern dass z.B. Wasser, NaCl- oder Ringerlösung o.ä. bei vielen Probenarten den gleichen Zweck erfüllen wie Selektivanreicherungsmedien. Andere Autoren betonen, wie wichtig ein gutes Selektivanreicherungsmedium für die Isolation von Salmonellen aus dem Untersuchungsmaterial ist (STOKES & OSBORNE, 1955; IVESON, 1972).

#### **Tetrathionatanreicherung**

KAUFFMANN (1935) entwickelte aus Tetrathionat, Brillantgrün und Rindergalle ein Medium für Selektivanreicherung. Die meisten Salmonellen sind fähig, Tetrathionat zu reduzieren; sie können sich in einem solchen Medium gut vermehren. Bei *S. Typhi* ist die Fähigkeit zur Tetrathionatreduktion nur schwach ausgeprägt, bei *S. Paratyphi A* nicht vorhanden, weshalb dieses Medium für diese Serovare ungeeignet ist. *Proteus* dagegen ist ein starker Tetrathionatreduzierer, der die Isolation und Identifikation von Salmonellen aus diesem Medium behindern kann (KNOX et al., 1943; JEFFRIES, 1959). Die Tetrathionatanreicherung ist weitverbreitet für Fäzes und anderweitig kontaminiertes Material; es wurden vielfältige Modifikationen entwickelt und Wachstoffsstoffe oder Inhibitoren zugesetzt, aber *S. Choleraesuis* und andere Serovare wachsen in diesen Medien oft nicht (IVESON & MACKAY-SOLLAY 1969). VASSILIADIS et al. (1974) stellten eine z.T. deutliche Hemmung einiger Serovare in



Tetrathionat fest. CARLSON & SNOEYENBOS (1974) verglichen mehrere Tetrathionatmodifikationen mit verschiedenen Selenitmedien und fanden für alle 88 getesteten Serovare Tetrathionat besser als Selenit, sowohl bei 37 und 43 °C als auch nach 24 und 48 Stunden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen SNOEYENBOS & CARLSON (1972) mit mehreren getesteten Arizona-Serovaren. Auch HUGUES et al. (1978) ziehen Tetrathionat der Selenitanreicherung vor.

### **Selenitanreicherung**

LEIFSON (1936) fand heraus, dass sich *S. Typhi* bei einem Gehalt von 1 % Natriumselenit in Peptonwasser vermehren kann, ein Großteil der gramnegativen Begleitflora, die die Isolation und Identifikation von Salmonellen erschweren kann, aber gehemmt wird. Da sich bei diesem Selenitgehalt nicht alle *S. Paratyphi* B-Stämme vermehren konnten, empfahl er die Verwendung von drei verschiedenen Selenitmedien für unterschiedliches Untersuchungsgut: Selenit S mit 1,5 % Selenit für Abwasser (Sewage), Selenit F mit 0,4 % für Fäzes und Selenit M mit 0,2 % für Milch. HARVEY & PRICE (1964) fanden eine Konzentration von 0,8 % für *S. Typhi* besser; diese ermöglicht auch eine Unterscheidung von *S. Typhimurium* und *S. Paratyphi* B.

Selenit F ist – ebenso wie die Tetrathionatanreicherung – für Fäzes und anderweitig kontaminiertes Material weitverbreitet; auch hier wurden vielfältige Modifikationen entwickelt, z.B. Zusatz von Cystin (NORTH & BARTRAM, 1953; LAPAGE & BASCOMB, 1968), jedoch wachsen auch in ihnen manche Serovare wie z.B. *S. Choleraesuis* und andere oft nicht (SMITH, 1959; WILLIAMS SMITH, 1959; IVESON & MACKAY-SOLLAY 1969; SHARMA & PACKER, 1969; HARVEY & PRICE, 1976; HARVEY & PRICE, 1979). Viele Autoren erhalten mehr Salmonellenisolate mit dieser Anreicherung als mit Tetrathionat (HARVEY & PRICE, 1976), die meisten jedoch mit einer Kombination beider Medien, da jedes seine Vor- und Nachteile hat (WILLIAMS SMITH, 1952; STOKES & OSBORNE, 1955; HARVEY & PRICE, 1976; HARVEY & PRICE, 1979). STOKES & OSBORNE (1955) und HUGUES et al. (1978) sehen einen großen Nachteil der Selenitanreicherung darin, dass *E. coli* nur in den ersten Stunden und *Hafnia*, *Citrobacter* und *Proteus* nicht gehemmt werden, sondern sich ungehindert vermehren (LAPAGE & BASCOMB, 1968; HUGUES et al., 1978). Diese Bakterien kommen häufig als Begleitflora neben Salmonellen vor und erschweren die Identifikation.



### Salmonellenanreicherungsmedium nach RAPPAPORT

RAPPAPORT et al. (1956) entwickelten ein Anreicherungsmedium aufgrund der Entdeckung, dass Salmonellen gegenüber Austrocknung resistenter sind als Begleitkeime. Dieses Medium enthält Magnesiumchlorid in hypertonischer Konzentration und einen Anteil an Malachitgrün, der auf die meisten Darmkeime und *S. Typhi* definitiv toxisch wirkt; außerdem hat es einen relativ niedrigen pH-Wert, den Salmonellen ebenfalls besser vertragen als viele Begleitkeime (VAN SCHOTTHORST & RENAUD, 1983). In dieses nach RAPPAPORT benannte Medium darf nur wenig Probenmaterial, am besten nur wenige Tropfen einer 1:1000 Fäzesverdünnung, inokuliert werden, sonst verliert es seine hemmenden Eigenschaften (VASSILIADIS et al., 1978; HARVEY & PRICE, 1980; VASSILIADIS, 1983). IVESON & KOVACS (1967) erhielten jedoch bessere Ergebnisse bei Verwendung unverdünnter Fäzes. Nach ihrer Einschätzung liefert bei Verwendung eines einzigen Mediums die Anreicherung nach RAPPAPORT die beste Salmonellenisolierungsrate, da sie jedoch für *S. Typhi* ungeeignet ist, muss bei Erwartung dieses Serovars ein passendes Medium eingesetzt werden. Viele Autoren schätzen an diesem Medium, dass es mehr Salmonellenisolierungen als Selenit F und Tetrathionat ermöglicht und die Begleitflora stärker hemmt (HOOPER & JENKINS, 1965; IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1972; VASSILIADIS et al., 1981; STELLMACHER & BIEWALD, 1987), allerdings auch hier wieder mit dem Nachteil, dass es für die Isolierung von einigen Serovaren wie *S. Typhi*, *S. Paratyphi B*, *S. Dublin* und *S. Pullorum* ungeeignet ist (IVESON & KOVACS, 1967; IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1969; IVESON, 1972; HARVEY & PRICE, 1979; STELLMACHER & BIEWALD, 1987). Trotz starker Inokulation überlebten bei VASSILIADIS (1968) in dem Anreicherungsmedium nach RAPPAPORT nur drei von elf Arizonastämmen. Für die Isolation von *S. Choleraesuis* ist es besser geeignet als Tetrathionat- oder Selenitanreicherung (VASSILIADIS, 1968; HARVEY & PRICE, 1979; STELLMACHER & BIEWALD, 1987). Die Modifizierung nach VASSILIADIS et al. (1978) hemmt die Begleitflora stärker als das ursprüngliche Medium, vor allem die laktosenegativen Keime, die auf festen Nährböden salmonellenähnliche Kolonien hervorbringen und in der Diagnostik deshalb besonders störend wirken (VASSILIADIS et al., 1978; VASSILIADIS et al., 1979; VASSILIADIS et al., 1981; VASSILIADIS, 1983). Dieses Medium eignet sich auch für Bebrütung bei 43 °C und ist leistungsfähiger als Tetrathionat. Weitere Vorteile dieses Mediums sind die Tatsachen, dass die gebrauchsfertige Lösung lange haltbar und das Medium



billig und sehr beständig in seiner Leistung ist (VASSILIADIS et al., 1981; VASSILIADIS, 1983).

### **Weitere Selektivanreicherungsmedien**

Iveson entwickelte mehrere Anreicherungsmedien, die auf der hemmenden Wirkung von Strontium beruhen, und bevorzugt diese für die Isolierung einiger Salmonellen, für Arizonakeime und für Proben von Reptilien (IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1969; IVESON, 1972; IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1972). Nach HARVEY & PRICE (1968) eignet sich EE (*Enterobacteriaceae*-Enrichmentbroth) besser als Selenit F für die Anzucht von Salmonellen aus Reptilien.

SHARMA & PACKER (1969) bevorzugen für Fäzes von bestimmten Säugern Brillantgrün-MacConkey-Anreicherungsbouillon gegenüber Selenit oder Tetrathionat.

### **Zweitianreicherung**

Der Sinn und Zweck einer Zweitianreicherung wurde von JAMESON (1962 und 1963) studiert und von MULINDWA & PIETZSCH (1979) und VAN SCHOTTHORST et al. (1983) übernommen. Danach ist der optimale Zeitpunkt der Überimpfung aus der ersten in die zweite Anreicherung sehr wesentlich, jedoch stark abhängig von dem zu isolierenden Bakterium und der jeweils anwesenden Begleitflora, von ihrer jeweiligen Ausgangskeimzahl und ihrer Generationszeit. Auch die Inokulationsmenge und das Volumen der Anreicherungslösung haben entscheidenden Anteil an Erfolg oder Misserfolg der Anzucht. Da große Unterschiede nicht nur bei verschiedenem Probenmaterial, sondern auch innerhalb einer Probenart bestehen, empfiehlt JAMESON (1963) eine Erstanreicherung in einem kleinen Volumen Nährbouillon, gefolgt von einer Zweitianreicherung in einem großen Volumen Selektivanreicherungsmedium. TRUSCOTT (1983) erhält bei einer Zweitianreicherung aus der sieben Tage bei Zimmertemperatur gelagerten Erstanreicherung im gleichen Medium einen deutlichen Anstieg der Salmonellenisolate.

#### **2.2.3.2 Feste Selektiv- und Differenzierungsnährböden**

Auch hier existieren sehr viele verschiedene Nährmedien, die sich in der Hemmung der Begleitflora, der Förderung von einzelnen Salmonellenserovaren und der Differenzierbarkeit



der Salmonellenkolonien von Begleitkeimen mehr oder weniger stark unterscheiden. Ein gutes Differenzierungsmedium soll Salmonellen und Nichtsalmonellen leicht unterscheidbar machen und nur wenige falsch-positive, aber noch weniger falsch-negative Ergebnisse bringen. Der erste Fall bedeutet für den Untersucher einen erheblichen Mehraufwand aufgrund der weiteren Differenzierung vieler salmonellenverdächtiger Kolonien. Der zweite Fall bedeutet das Nichterkennen von salmonellenpositiven Proben. Wünschenswert ist ein Medium, auf dem alle Salmonellen wachsen können und erkannt werden, während alle Begleitkeime gehemmt werden oder von Salmonellen ohne weitere aufwändige Laboruntersuchungen deutlich zu unterscheiden sind (IVESON & MACKAY-SOLLAY, 1969).

### **Brillantgrün-Nährböden**

Nährböden mit Brillantgrünzusatz (BG) zur Hemmung der grampositiven Begleitflora wurden oft modifiziert. Viele Untersucher finden den BG-MacConkey-Agar am besten, darauf werden aber manche *S. Dublin*- und *S. Typhi*-Stämme gehemmt (HOBBS & ALLISON, 1945; HARVEY & THOMSON, 1953; THOMSON, 1955; HARVEY, 1956; HARVEY & PRICE, 1968). SHARMA & PACKER (1969) ziehen den BG-Neutralrot-Laktose-Agar dem Desoxycholat- und erst recht dem Wismutsulfit-Agar vor. Bei Koloniezählungen finden BANWART & AYRES (1953) kaum einen Unterschied in der Koloniezahl auf BG-Agar zu Nähragar. GEORGALA & BOOTHROYD (1965) isolieren die meisten Salmonellen auf BG-Agar. Andere Untersucher bemängeln an diesen Nährböden, dass sich Begleitflora darauf gut entwickeln kann, sowohl laktosepositive als auch die besonders störende laktosenegative, da solche Kolonien mit Salmonellen verwechselt werden können und in intensiver Untersuchung von diesen differenziert werden müssen; das bedeutet einen erheblichen Mehraufwand an Arbeit und Material.

### **Desoxycholat-Zitrat-Nährböden**

Nach BANWART & AYRES (1953) ist dieser Nährboden für alle Salmonellen etwas hemmend; *S. Paratyphi A* bildete bei ihnen nur 1 % der Kolonien, die auf normalem Nähragar gewachsen waren. Andere Selektivagars wirken z.T. ebenfalls hemmend auf Salmonellen, manche mehr, manche weniger, was auch vom jeweiligen Serovar abhängt. Der DCLS- (Desoxycholat-Zitrat-Laktose-Saccharose) und der SS-Agar (*Salmonella-Shigella*), der dem DCLS sehr ähnlich ist, hemmen jedoch statistisch signifikant am stärksten. HARVEY &



PRICE (1968) lesen den DC-Agar (Desoxycholat) erst nach einer Bebrütung von 48 Stunden ab, da diese Zeit zur Unterscheidung zwischen *Proteus*- und Salmonellenkolonien nötig ist; außerdem bestätigen diese Autoren das Auftreten einer Zone additiver Hemmung bei Beimpfung dieses Nährbodens aus einer Selenitanreicherung an der Stelle der stärksten Beimpfung, an der sich keine Kolonien entwickeln. Diese additive Hemmung wurde schon von GEORGALA & BOOTHROYD (1965) festgestellt.

### **Hektoen-Entero-Agar**

KING & METZGER (1968a und b) und GOO et al. (1973) halten den Hektoen-Entero-Agar (HE) hinsichtlich der Selektivität und Differenzierbarkeit von Salmonellen- und Nichtsalmonellenkolonien für den besten Nährboden sowohl für Direktausstrich als auch nach Anreicherung. HOBEN et al. (1973) verbesserten diesen Nährboden durch Zusatz von Novobiocin. Dadurch werden *Citrobacter* um 50 % reduziert und *Proteus* vollständig gehemmt, während Salmonellen in ihrer Vermehrung nicht beeinflusst werden.

### **Wismutsulfit-Agar**

Dieser Agar wurde ursprünglich für die Isolierung von *S. Typhi* entwickelt (WILSON, 1923; WILSON & BLAIR, 1926, 1927 und 1931). Für die Isolierung anderer Serovare sollte er entweder vier bis fünf Tage im Kühlschrank abgelagert werden, bis die Hemmwirkung etwas nachlässt, oder 48 Stunden lang bebrütet werden, damit sich typische Salmonellenkolonien bilden können (MCCOY, 1962; HARVEY & PRICE, 1968); die Modifikation ist aber für alle Serovare geeignet. IVESON & MACKAY-SOLLAY (1969), BLACKBURN & ELLIS (1973), HARVEY & PRICE (1979) und RUIZ et al. (1996) empfehlen diesen Nährboden besonders auch für Subspezies III und laktosepositive Salmonellenstämme, da er nicht auf Laktosespaltung als Indikatorsystem beruht. Für eine Kombination mit Selenitanreicherung ist er nicht geeignet, da an der Stelle der stärksten Beimpfung eine Zone additiver Hemmung auftritt, in der keine Kolonien wachsen, wie schon beim Desoxacholat-Agar beschrieben (WILLIAMS SMITH, 1952; GEORGALA & BOOTHROYD, 1965; HARVEY & PRICE, 1968; HARVEY & PRICE, 1979). SHARMA & PACKER (1969) erhalten in ihrer Untersuchung mit diesem Nährboden schlechtere Ergebnisse als mit allen anderen Nährböden, die sie einsetzten.



### **Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar**

Dieser Nährboden wurde ursprünglich für die Isolation und Identifikation von Shigellen entwickelt: Diese können als einzige den Zucker Xylose nicht fermentieren, eine Säuerung des Nährbodens bleibt bei Shigellenwachstum also aus. Um eine ähnlich Morphologie auch von Salmonellenkolonien zu erlangen, wurde Lysin zugesetzt, das von Salmonellen dekarboxyliert wird, was eine Alkalisierung des Nährbodens bewirkt: Er ist dann ähnlich wie bei Shigellen gefärbt. Ein Überschuss an Laktose und Saccharose ruft eine Säuerung des Nährbodens bei anderen Lysin spaltenden Bakterien hervor. Ein H<sub>2</sub>S-Indikatorsystem färbt Salmonellen- und Arizonastämme, während bei lysindekarboxylasenegativen Bakterien die Schwärzung wegen des niedrigen pH-Wertes ausbleibt. Desoxycholat ist als Hemmstoff zugesetzt (TAYLOR, 1965).

DUSCH & ALTWEGG (1995) vergleichen sechs verschiedenen Nährböden in ihrer Sensitivität und Spezifität. Eine Modifikation des XLD-Agars mit dem Detergens Tergitol 4 als Inhibitor erreicht fast vollständige *Proteus*-Hemmung. Dieser XLT 4 genannte Nährboden findet zusammen mit dem HE-Agar die größte Anerkennung der Autoren nach dem MSRVMedium (Modified Semisolid RAPPAPORT-VASSILIADIS), das hinsichtlich seiner Leistung am besten abschneidet, wegen seiner halbflüssigen Konsistenz im Umgang aber etwas unhandlich ist. Manche Serovare wie *S. Typhi* und *S. Paratyphi A* wachsen auf XLT 4 nicht. Auch MILLER et al. (1991) finden die meisten Salmonellenisolate und die reinsten Kulturen auf XLT 4.

### **RAMBACH-Agar**

RAMBACH (1990) entwickelte einen nach ihm benannten Nährboden, mit dem die Identifikation von Salmonellen erheblich erleichtert werden soll: Sie bilden auf diesem Agar leuchtend rote, leicht zu erkennende und von Begleitkeimen einfach zu differenzierende Kolonien. Ursache für diese Rotfärbung, die für mindestens 72 Stunden erhalten bleibt, ist die Säurebildung aus Propylenglykol. Ein Farbindikator für  $\beta$ -Galaktosidase deckt laktosepositive Bakterien auf; sie erscheinen blau, wie z.B. *E. coli*, wenn sie laktosepositiv sind, aber Propylenglykol nicht spalten können, und violett wie *Citrobacter*, wenn sie sowohl Laktose als auch Propylenglykol spalten. *Proteus*-Kolonien, die weder Laktose noch Propylenglykol spalten, sind farblos. Dieser Nährboden ist für die Differenzierung von *S. Typhi* nicht geeignet, da dieses Serovar farblose Kolonien bildet. FREYDIERE & GILLE (1991) bestätigen die Qualität die-



ses Agars; die wenigen untypischen farblosen Salmonellen identifizieren sie sehr leicht aufgrund einer Esteraseaktivität, die bei anderen laktosenegativen *Enterobacteriaceae* nicht vorhanden ist. Rote *Pseudomonas*- und *Acinetobacter*-Kolonien können von typischen, leuchtend roten Salmonellenkolonien durch ihre mehr himbeerrote Farbe unterschieden werden (GRUENEWALD et al., 1991). Auch DUSCH & ALTWEGG (1995) stellen fest, dass der RAMBACH-Agar für die Isolation typhoider Salmonellenstämme wie *S. Typhi* und *S. Paratyphi A* nicht geeignet ist.

#### 2.2.4 Bebrütungszeit

CHATTOPADHYAY & PILFOLD (1976) fanden bei der auf 72 Stunden verlängerten Bebrütung von menschlichen Fäzes in Selenit F weitere positive Proben, die nach 24 und 48 Stunden nicht erkannt worden waren. Die Proben stammten von Rekonvaleszenten oder symptomlosen Ausscheidern, bei denen die Salmonellenzahl im Stuhl sehr viel niedriger ist als bei akut Erkrankten (THOMSON, 1955). Obwohl diese Methode eine Verzögerung bis zur endgültigen Abklärung mit sich bringt, halten CHATTOPADHYAY & PILFOLD (1976) sie für gerechtfertigt, da geringe Salmonellenzahlen in Fäzesproben mit existierenden Anreicherungsverfahren nicht immer erkannt werden. Auch SILLIKER et al. (1964) und GEORGALA & BOOTHROYD (1965) bewerten eine verlängerte Inkubationszeit als günstig für Selenit, da dadurch mehr Proben als salmonellenpositiv identifiziert werden können. Besonders vorteilhaft ist die Verlängerung, wenn im Ausgangsmaterial nur wenige Salmonellen, aber viele Begleitkeime vorliegen. Im Laufe der Zeit nehmen die Salmonellen im Verhältnis zur Begleitflora zu. In Tetrathionat hingegen wirkt sich eine verlängerte Bebrütung schädlich auf die Salmonellen aus, was schon WILLIAMS SMITH (1952) erwähnt. SNOEYENBOS & CARLSON (1972) und CARLSON & SNOEYENBOS (1974) können auch nach 54 Stunden Bebrütung in Tetrathionat keine Abnahme der Arizona- und Salmonellenzahlen erkennen, dagegen stellen sie in einigen Selenitanreicherungen nach 24 Stunden ein Absterben der gesuchten Bakterien fest. Die meisten Salmonellenisolate entdeckt MCCOY (1962) beim Ausstrich aus Tetrathionat nach 24 und 48 Stunden, jedoch finden sich zu jedem weiteren Ausstrichzeitpunkt neue bis dahin nicht erkannte positive Proben; je größer die Anzahl der in der Probe vorhandenen Salmonellen ist, umso früher sind sie nachweisbar.



### 2.2.5 Bebrütungstemperatur

SPINO (1966) und NABBUT (1973) konnten mehr Salmonellen isolieren, wenn die Proben bei 41,5 statt bei 37 °C bebrütet wurden. Die erhöhte Temperatur in Kombination mit selektiven Medien steigert die Selektivität; Begleitkeime werden stärker gehemmt, dadurch liegen Salmonellen in relativ reiner Kultur vor und können leichter nachgewiesen werden. Grund dafür sind die verlängerte lag-Phase und Generationszeit der Begleitflora, während bei Salmonellen durch die erhöhte Temperatur die lag-Phase verkürzt wird; dies erlaubt einen früheren Eintritt in die log-Phase und verkürzt die Generationszeit. CARLSON & SNOEYENBOS (1972) registrieren bei Bebrütung bei 43 °C ein Absterben von Nichtsalmonellen während einer Periode, in der die Salmonellenpopulation stabil bleibt. Damit begründen sie auch eine verlängerte Inkubation bis zu 48 Stunden. Aufgrund der größeren Reinheit der Kulturen bevorzugen mehrere Autoren eine Temperatur von 43 °C (GEORGALA & BOOTHROYD, 1965; CARLSON et al., 1967; HARVEY & PRICE, 1968; BÄNFER, 1971; WATSON & WALKER, 1978; HARVEY & PRICE, 1979; VASSILIADIS et al., 1979; TRUSCOTT, 1983; DUSCH & ALTWEGG, 1995). HARVEY & THOMSON (1953) erhalten in ihrer Studie 43 °C als optimale Bebrütungstemperatur für Selenit, geben jedoch den Hinweis, dass 42 °C sicherer ist, da 43 °C die obere Temperaturgrenze darstellen könnte. Die Vorteile der Bebrütung bei erhöhter Temperatur sind schon sehr lange bekannt (MACCONKEY, 1908). IVESON & MACKAY-SOLLAY (1969) halten sowohl 37 als auch 43 °C für die Anzucht von Salmonellen in ihrer Strontiumanreicherung für geeignet, während die Anreicherung nach RAPPAPORT für eine Temperatur über 37 °C ungeeignet ist (RHODES et al., 1985). Für feste Selektivmedien ist eine erhöhte Temperatur nicht empfehlenswert (HARVEY & PRICE, 1979). Manche Serovare, z.B. *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* oder *S. Pullorum*, wachsen bei einer Temperatur von 43 °C nicht (HARVEY & PRICE, 1979; DUSCH & ALTWEGG, 1995). SNOEYENBOS & CARLSON (1972) und CARSLON & SNOEYENBOS (1974) können in verschiedenen Tetrathionatanreicherungen durch eine erhöhte Bebrütungstemperatur weder positive noch negative Auswirkungen auf die Isolierung von Arizona- oder Salmonellenserovaren feststellen, registrieren aber in bestimmten Selenitanreicherungen neben stärkerer Hemmung der Begleitflora auch ein Absterben mancher Arizona- und Salmonellenstämme bei höherer Temperatur.



### **2.2.6 Reinkulturen und Laborstämme**

Manche Untersuchungen wurden mit Reinkulturen mit und ohne Probenmaterial durchgeführt (STOKES & OSBORNE, 1955; TRUSCOTT, 1983; RUIZ et al., 1996). Dabei ist zu beachten, dass bei Anwesenheit von Begleitkeimen und Probenmaterial ein anderes Ergebnis erzielt werden kann. Bereits länger kultivierte Salmonellenstämme können sich verändert haben und andere Reaktionen und Wachstumsfähigkeiten besitzen als frische Isolate (WILLIAMS SMITH, 1952). So berichten BAKER et al. (1972) von Arizonakeimen, die bei der Erstisolierung auf Selektiv- und Differenzierungsmedien laktosenegativ waren, bei einer folgenden Subkultur aber Laktose spalten konnten. Inokuliertes Untersuchungsmaterial kann einen Einfluss auf die Selektivität des Anreicherungsmediums ausüben; bei Versuchen mit Reinkulturen tritt dieser nicht zutage und kann auch nicht abgeschätzt werden (SMITH, 1959). Aus diesen Gründen können Ergebnisse, die an künstlich kontaminierten Proben gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf „natürlich kontaminierte“ Proben übertragen werden (VASSILIADIS et al., 1974). Die Ergebnisse von verschiedenen Untersuchungen lassen sich auch deshalb nicht direkt vergleichen, da manchmal sehr kleine Inokula von maximal 20 Zellen, manchmal aber auch 50 000 Zellen eingesetzt wurden. Eine nur geringfügige Hemmung in einem bestimmten Medium kann sich bei nur 20 inokulierten Zellen sehr viel dramatischer auswirken und insgesamt eine schlechte Bewertung für das Medium verursachen, während die schlechte Leistung bei einem großen Inokulum möglicherweise nicht auffällt (SNOEYENBOS & CARLSON, 1972; CARSLON & SNOEYENBOS, 1974; JONES et al., 1984).

## **2.3 ZIELSETZUNG**

In der vorliegenden Studie sollte anhand von Laborstämmen Wachstumsvermögen und -charakteristik von Reptiliensalmonellen in verschiedenen Selektiv- und Differenzierungsmedien untersucht werden. Eine geeignete Bebrütungstemperatur für die Selektivanreicherung wurde gesucht.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch eine Feldstudie überprüft und verifiziert.



## **3. MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 NÄHRMEDIEN**

#### **3.1.1 Flüssige Nährmedien**

##### **3.1.1.1 Nährbouillon**

Standard I-Nährbouillon der Fa. Merck (Art.-Nr. 7882), Zubereitung nach Angaben des Herstellers.

##### **3.1.1.2 Selektivanreicherungsmedien**

Drei verschiedene Selektivanreicherungsmedien der Fa. Merck wurden eingesetzt, sie wurden nach Herstellerangaben angefertigt:

- Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT (Art.-Nr. 10236)
- Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS (R 10) (Art.-Nr. 7700)
- Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon (Art.-Nr. 7709)

#### **3.1.2 Feste Nährböden**

##### **3.1.2.1 Nähragar**

Standard I-Nähragar der Fa. Merck (Art.-Nr. 7881), Zubereitung nach Angaben des Herstellers, wird in Zukunft mit „N1“ abgekürzt.



### 3.1.2.2 Selektiv- und Differenzierungsnährböden

Es wurden neun verschiedene Selektiv- und Differenzierungsnährböden für Salmonellen der Firmen Merck und Oxoid verwendet, die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben:

- BPLS-Agar (Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar), Fa. Merck (Art.-Nr. 7237)
- DCLS-Agar (Desoxycholat-Citrat-Lactose-Saccharose-Agar), Fa. Merck (Art.-Nr. 10270)
- HEKTOEN-Enter-Agar, Fa. Merck (Art.-Nr. 11681), wird fortan mit „HE“ abgekürzt
- MLCB-Agar (Mannit-Lysin-Kristallviolett-Brillantgrün-Agar), Fa. Oxoid (Art.-Nr. CM 783)
- RAMBACH-Agar, Fa. Merck (Art.-Nr. 1.07500)
- Salmonellen-Agar nach ÖNÖZ, Fa. Merck (Art.-Nr. 1978)
- SS-Agar (Salmonella-Shigella-Agar), Fa. Merck (Art.-Nr. 7667)
- Wismut-Sulfit-Agar nach WILSON-BLAIR, Fa. Merck (Art.-Nr. 5418), wird in Zukunft „WS“ genannt
- XLD-Agar (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar), Fa. Merck (Art.-Nr. 5287)

### 3.1.3 Lagerung der fertigen Nährmedien

Die gebrauchsfertigen Nährmedien wurden im Kühlschrank gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

## 3.2 LABORTESTS

### 3.2.1 Gramfärbung

Zur Unterscheidung gramnegativer und grampositiver Bakterien wurde die Gramfärbung mod. nach Hucker durchgeführt, Angaben dazu in BURKHARDT (1992).



### **3.2.2 Biochemische Differenzierung**

#### **3.2.2.1 Cytochromoxidase**

Das Vorhandensein von Cytochromoxidase wurde mit Hilfe der Teststäbchen Bactident Oxidase der Fa. Merck (Art.-Nr. 1.13300) nach Herstellerangaben geprüft.

#### **3.2.2.2 Bunte Reihe**

Zur weiteren biochemischen Differenzierung von *Enterobacteriaceae* wurde das API 20 E-System, Fa. Bio Merieux (Art.-Nr.20100), verwendet. Der Test wurde nach Herstellerangaben angelegt, 24 Stunden bei 37 °C bebrütet und nach Zugabe der erforderlichen Zusatzreagenzien mittels des zugehörigen Analytischen Profil Index (Art.-Nr. 20190) ausgewertet.

### **3.2.3 Serologische Differenzierung**

Die serologische Differenzierung und Bestätigung salmonellenverdächtiger Isolate wurde im NRL-SALM (Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Salmonellen am BgVV [Bundesgesundheitsinstitut für Veterinärmedizin und Verbraucherschutz, heute BfR {Bundesinstitut für Risikobewertung}]) vorgenommen.

## **3.3 SALMONELLENSTÄMME**

### **3.3.1 Salmonellenstämme vom NRL-SALM**

Als Basis für die Untersuchung dienten 24 Wildstämme aus den Subspezies I, II, IIIa, IIIb und IV, die aus Reptilien isoliert und dem NRL-SALM von verschiedenen Einsendern zur serologischen Differenzierung zugeschickt worden waren (Tab. 8):

**Tab. 8:** *Salmonellenstämme des NRL-SALM*

| NRL-SALM-Nr. | Subspezies | Serovarname/<br>Antigenformel                          | isoliert aus Tierart                      | BU von |
|--------------|------------|--|---|--------|
| 123          | I          | <i>S. Javiana</i> 9,12:l,z <sub>28</sub> :1,5          | Schildkröte, k.w.A.                       | Darm   |
| 171          | I          | <i>S. Kisarawe</i> 11: k:e,n,x                         | Bartagame, <i>Pogona vitticeps</i>        | k.A.   |
| 270          | I          | <i>S. Gaminara</i> 16:d:1,7                            | Gecko, k.w.A.                             | k.A.   |
| 612          | I          | <i>S. Aqua</i> 30:k:1,6                                | Hornvipser, <i>Cerastes cerastes</i>      | k.A.   |
| 2541         | I          | <i>S. Newport</i> 6,8:e,h:1,2                          | Tigerpython, <i>Python molurus</i>        | k.A.   |
| 237          | II         | 4,12,27:-:1,6  | Schildkröte, k.w.A.                       | k.A.   |
| 676          | II         | 50:b:z <sub>6</sub>                                    | Chamäleon, k.w.A.                         | Kot    |
| 686          | II         | 58:d:z <sub>6</sub>                                    | Winkelkopfgame, <i>Gonocephalus spec.</i> | k.A.   |
| 848          | II         | 47:a:1,5   | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>       | k.A.   |
| 872          | II         | 13,22:z <sub>29</sub> :1,5                             | Schildkröte, k.w.A.                       | k.A.   |
| 181          | IIIa       | 41:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Kaiserboa, <i>Boa constrictor</i>         | k.A.   |
| 1695         | IIIa       | 42:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-                  | Schlange, k.w.A.                          | k.A.   |
| 2315         | IIIa       | 56:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Reptil, k.w.A.                            | Kot    |
| 2509         | IIIa       | 53:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> ,z <sub>32</sub> :- | Kragenechse, <i>Chlamydosaurus kingii</i> | k.A.   |
| 148          | IIIb       | 61:i:z   | Schlange, k.w.A.                          | k.A.   |
| 151          | IIIb       | 47:z <sub>52</sub> :e,n,x,z <sub>15</sub>              | Schlange, k.w.A.                          | k.A.   |
| 486          | IIIb       | 58:z <sub>52</sub> :z <sub>35</sub>                    | Schlange, k.w.A.                          | Darm   |
| 605          | IIIb       | 18:l,v:z   | Phyton, k.w.A.                            | Kot    |
| 982          | IIIb       | 65:z <sub>10</sub> :e,n,x,z <sub>15</sub>              | Chamäleon, k.w.A.                         | k.A.   |
| 152          | IV         | 45:g,z <sub>51</sub> :-                                | Leguan, k.w.A.                            | k.A.   |
| 162          | IV         | 6,7:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-                 | Chamäleon, k.w.A.                         | k.A.   |
| 359          | IV         | 44:z <sub>4</sub> ,z <sub>32</sub> :-                  | Viper, <i>Vipera spec.</i>                | k.A.   |
| 1740         | IV         | 42:z <sub>36</sub> :-                                  | Reptil, k.w.A.                            | Kot    |
| 3878         | IV         | 11:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Bartagame, <i>Pogona vitticeps</i>        | k.A.   |

**Abkürzungen:** BU: bakteriologische Untersuchung; k.A.: keine Angaben; k.w.A.: keine weiteren Angaben; spec.: Spezies

### 3.3.2 Salmonellenstämme vom ZFF

Im Weiteren wurden auch 42 Salmonellenstämme in die Untersuchung mit einbezogen, die vom ZFF (Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München) im Zeitraum von Juni 1998 bis Mai 2002 bei der Routinediagnostik isoliert wurden (Tab. 9).

Der Vorteil dieser Salmonellenstämme ist, dass sie durch keinerlei Selektiv- oder Anreicherungsmethoden selektiert wurden, da bei der Routinediagnostik im ZFF alle Proben grundsätzlich direkt auf N1 und BPLS ausgestrichen werden und jede unterscheidbare Einzelkolo-



Tab. 9: Salmonellenstämme vom ZFF

| ZFF-Nr. | Subspez. | Serovarname/<br>Antigenformel                          | isoliert aus Tierart   | BU von             |
|---------|----------|--|--|--------------------|
| 42/99   | I        | S. Aprad 45:z <sub>10</sub> :-                         | Kaiserboa, <i>Boa constrictor</i>  | Abszess            |
| 2053/99 | I        | S. Hvittingfoss 16:b:e,n,x                             | Bartagame, <i>Pogona vitticeps</i>   | Organe             |
| 92/00   | I        | S. Rubislaw 11:r:e,n,x                                 | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |
| 550/00  | I        | S. Oranienburg 6,7:m,t:-                               | Stachelleguan, <i>Sceloporus spec.</i>                                       | Organe             |
| 3120/00 | I        | S. Kottbus 6,8,e,h:1,5                                 | Maurische Landschildkröte, <i>Testudo hermanni</i>                           | Organe             |
| 3886/00 | I        | S. Stanley 4,5,12:d:1,2                                | Scharnierschildkröte, <i>Cuora spec.</i>                                     | Organe             |
| 18/01   | I        | S. Mundonobo 28:d:1,7                                  | Klapperschlange, <i>Crotalis atrox</i>                                       | Organe             |
| 39/01   | I        | S. Johannesburg 40:b:e,n,x                             | Dornschwanzagame, <i>Uromastix acanthinurus</i>                              | Organe, Kot        |
| 197/99  | II       | 21:z <sub>10</sub> :-                                  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Hautbioptat        |
| 1230/99 | II       | 13,22:z <sub>29</sub> :1,5                             | Mittelasiatische Vierzehen-Steppenschildkröte, <i>Agrionemys horsfieldii</i> | Kot                |
| 36/99   | IIIa     | 41:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Kornnatter, <i>Elaphe guttata</i>  | Organe             |
| 682a/99 | IIIa     | 42:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Dreihornchamäleon, <i>Chamaeleo jacksonii</i>                                | Organe             |
| 1771/99 | IIIa     | 48:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-                  | Stachelleguan, <i>Sceloporus spec.</i>                                       | Organe             |
| 1095/98 | IIIa     | 53:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> ,z <sub>32</sub> :- | Kragenechse, <i>Chlamydosaurus kingii</i>                                    | Organe             |
| 1702/02 | IIIa     | 48:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Wasseragame, <i>Physignatus concinnus</i>                                    | Organe             |
| 1328/98 | IIIb     | 48:i:z <sub>35</sub> :-                                | Puffotter, <i>Bitis arietans</i>   | Organe             |
| 1519/98 | IIIb     | 48:i:z   | Kornnatter, <i>Elaphe guttata</i>  | Organe             |
| 130/99  | IIIb     | 18:l,v,z   | Bartagame, <i>Pogona vitticeps</i>   | Kot                |
| 269/99  | IIIb     | 48:z <sub>52</sub> :z                                  | Anaconda, <i>Eunectes murinus</i>  | Organe             |
| 682b/99 | IIIb     | -:z <sub>52</sub> :z                                   | Dreihornchamäleon, <i>Chamaeleo jacksonii</i>                                | Organe             |
| 1360/99 | IIIb     | 47:l,v:z   | Pantherchamäleon, <i>Furcifer pardalis</i>                                   | Kot                |
| 1490/99 | IIIb     | 14:z <sub>10</sub> :z                                  | Tigerpython, <i>Python molurus</i>   | Organe             |
| 1484/99 | IIIb     | 65:z <sub>52</sub> :z <sub>35</sub>                    | Rautenpython, <i>Morelia spilotes</i>  | Organe             |
| 1830/99 | IIIb     | 21:l,v:z   | Zweistreifenchamäleon, <i>Chamaeleo bitaeniatus</i>                          | Organe             |
| 1899/99 | IIIb     | 50:k:z   | Jemenchamäleon, <i>Chamaeleo calypttratus</i>                                | Organe             |
| 2374/99 | IIIb     | 48:z <sub>52</sub> :z                                  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |
| 863/00  | IIIb     | 11:k:z <sub>53</sub>                                   | Strumpfbandnatter, <i>Tamnophis sirtalis</i>                                 | Organe             |
| 1169/01 | IIIb     | 48:i:z   | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |
| 344/01  | IIIb     | 48:k:z <sub>53</sub>                                   | Königpython, <i>Python regius</i>  | Kot                |
| 57/99   | IV       | 45:4,z <sub>23</sub> :-                                | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Kloakentupfer      |
| 194/99  | IV       | 44:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Dornschwanzagame, <i>Uromastix acanthinurus</i>                              | Abszess            |
| 521/99  | IV       | 6,7:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-                 | Jemenchamäleon, <i>Chamaeleo calypttratus</i>                                | Organe             |
| 2274/99 | IV       | 16:z <sub>4</sub> ,z <sub>32</sub> :-                  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |
| 743/00  | IV       | 40:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Wasseragame, <i>Physignatus concinnus</i>                                    | Organe             |
| 2684/00 | IV       | 11:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Kaiserboa, <i>Boa constrictor</i>  | Organe             |
| 2821/00 | IV       | 43:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Chamäleon, k.w.A.  | Organe             |
| 3853/00 | IV       | 40:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-                  | Kaiserboa, <i>Boa constrictor</i>  | Lungenlavage       |
| 148/01  | IV       | 38:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Kaiserboa, <i>Boa constrictor</i>  | Organe             |
| 156/01  | IV       | 44:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-                  | Bartagame, <i>Pogona vitticeps</i>   | Organe             |
| 1517/01 | IV       | 16:z <sub>4</sub> ,z <sub>32</sub> :-                  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |
| 1250/02 | IV       | 16:z <sub>4</sub> ,z <sub>32</sub> :-                  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Bauchhöhlenexsudat |
| 137/99  |          | S. s. r. ::  | Grüner Leguan, <i>Iguana iguana</i>  | Organe             |

**Abkürzungen:** BU: bakteriologische Untersuchung; k. w. A.: keine weiteren Angaben, S. s. r.: Salmonella serologisch rau; spec.: Spezies; Subspez.: Subspezies



nie weiterdifferenziert wird. Alle gramnegativen Stäbchen werden mit Hilfe eines API 20 E identifiziert.

Es ist zwar möglich, dass mit dieser Untersuchungsmethode nicht alle Salmonellen ausscheidenden Reptilien erkannt werden, z.B. wenn Salmonellen in zu geringer Keimzahl im Untersuchungsmaterial vorhanden sind, diejenigen Salmonellen jedoch, die isoliert werden, eignen sich besonders für die vorliegende Studie, da sie durch keinerlei biochemische Reaktionen selektiert sind und somit eine repräsentative Stichprobe der in den untersuchten Proben vorkommenden Salmonellen darstellen.

### **3.4 ERMITTLUNG EINER GEEIGNETEN INKUBATIONSTEMPERATUR FÜR DIE SELEKTIVANREICHERUNG**

#### **3.4.1 Allgemein**

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden, ob sich Salmonellen aus Reptilien bei Temperaturen, die für die Isolierung von Salmonellen aus homoiothermen Tieren üblich sind, ebenfalls vermehren und nachweisen lassen, oder ob eine niedrigere Temperatur günstiger ist. Hintergrund für diese Frage ist die Überlegung, dass Reptilien und Salmonellen gut aneinander angepasst sind, was die seltenen Krankheitsfälle bei salmonellenpositiven Reptilien belegen. Die im Reptilienorganismus herrschende Temperatur ist zwar abhängig von der Umgebungstemperatur und kann zeitweilig z.B. beim Sonnenbaden auch mehr oder weniger ansteigen, liegt jedoch keinesfalls ständig bei 37 °C. Es ist also durchaus vorstellbar, dass bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C oder höher das Wachstum von Reptiliensalmonellen nur eingeschränkt möglich ist, und somit bei einer auf homoiotherme Tiere ausgelegten Untersuchungsmethode Salmonellen ausscheidende Reptilien nicht erkannt werden.

Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde das Wachstum von Reptiliensalmonellen bei unterschiedlichen Temperaturen in drei verschiedenen Anreicherungsmedien über einen Zeitraum von etwa 36 bis 48 Stunden untersucht.



Anhand der Keimzahlen zu Beginn des Versuches und im Abstand von jeweils ca. 2,5 Stunden während der Inkubationsperiode wurde eine Wachstumskurve für die jeweilige Temperatur erstellt.

### **3.4.2 Durchführung**

#### **3.4.2.1 Eingesetzte Selektivanreicherungsmedien**

Für die Feststellung einer geeigneten Bebrütungstemperatur von Salmonellen aus Reptilien wurde die Zellvermehrung in den drei Salmonellen-Selektivanreicherungsmedien nach RAPPAPORT, nach RAPPAPORT und VASSILIADIS und Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon, die im Folgenden mit „R“, „RV“ und „S“ abgekürzt werden, untersucht.

#### **3.4.2.2 Untersuchte Temperaturen**

Das Wachstum wurde bei folgenden Temperaturen mit allen drei Anreicherungsmedien getestet: 28 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C und 42 °C. Für die Bebrütung der Kulturen wurde ein Brutschrank der Fa. Memmert verwendet.

Die vorbereiteten, im Kühlschrank gelagerten Medien wurden vor dem Beimpfen ca. 30 Minuten im Brutschrank auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt.

#### **3.4.2.3 Verwendeter Salmonellenstamm**

Für die Ermittlung einer geeigneten Temperatur für die Bebrütung der Selektivanreicherung für die Isolation von Salmonellen aus Reptilien wurde der Salmonellenstamm NRL-SALM 2509 ausgewählt. Hintergrund dafür war die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, eine Methode zu entwickeln, die sich für Anzucht und Nachweis von Salmonellen eignet, die typischerweise bei Reptilien vorkommen. Damit waren insbesondere Salmonellen der Subspezies IIIa und b gemeint.

Der Stamm NRL-SALM 2509 ist ein Vertreter der Subspezies IIIa mit der Antigenformel 53:Z<sub>4</sub>,Z<sub>23</sub>,Z<sub>32</sub>:-, der aus einer Kragenechse, *Chlamydosaurus kingii*, isoliert wurde (Tab. 8).



#### **3.4.2.4 Beimpfung der Selektivanreicherungsmedien**

Eine ca. 0,5 mm große Einzelkolonie wurde mit einer sterilen 1 ml Pipettenspitze aus einer BPLS-Agarplatte ausgestanzt und in einem Reagenzglas mit 5 ml Selektivanreicherungsbouillon suspendiert. Dieser Ansatz wurde in 1:10 -Schritten bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  in dem jeweiligen Anreicherungsmedium verdünnt. Aus den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ , die fortan als „3“ und „4“ bezeichnet werden, wurden jeweils 100 µl auf zwei N1-Agarplatten pipettiert und mit einem sterilen Drigalskispatel ausgespatelt. Demnach steht z.B. RV3 für die Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  in RV, RV4 für die Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  in RV, S3 entsprechend für die Verdünnungsstufe  $10^{-3}$  in S usw.

Die beimpften Platten wurden umgedreht bei 37 °C ca. 24 Stunden bebrütet, bis sich gut sichtbare Kolonien gebildet hatten, die ausgezählt werden konnten.

Die hier ermittelte Keimzahl stellt die Ausgangskeimzahl zu Beginn der Bebrütung, zum Zeitpunkt 0, dar. 3 und 4 wurden gewählt, weil in einer dieser beiden Verdünnungsstufen erfahrungsgemäß eine auszählbare Menge Kolonien (zwischen 30 und 300) entsteht.

#### **3.4.2.5 Bebrütung der beimpften Anreicherungsmedien**

Nach dem Ausplattieren wurden die Reagenzgläser mit den Verdünnungsstufen 3 und 4 in den Brutschrank auf einen Rüttler gestellt und bei der jeweils zu untersuchenden Temperatur insgesamt etwa 48 Stunden inkubiert.

#### **3.4.2.6 Keimzählung während der Bebrütungsperiode**

Über die gesamte Bebrütungsdauer von ca. 48 Stunden hinweg wurden im Abstand von ungefähr 2,5 Stunden Keimzählungen vorgenommen.

Dazu wurden von 3 und 4 Zehnfachverdünnungsreihen in steriler physiologischer Kochsalzlösung angelegt, von denen wiederum jeweils 100 µl auf N1 ausgespatelt wurden. Das Ausspateln erfolgte immer im Doppelansatz.

Um sicher zu gehen, dass eine auszählbare Menge Kolonien auf den Platten wächst, wurden immer mindestens drei aufeinander folgende Verdünnungsstufen ausgespatelt. Bei den ersten zwei bis drei Bebrütungsintervallen wurden zusätzlich auch aus 3 und 4 direkt je 100 µl auf



N1 ausgespatelt, im weiteren Verlauf der Inkubation wurde immer höher verdünnt, um auszählbare Platten zu bekommen, maximal bis  $10^{-6}$ .

Alle beimpften Platten wurden umgedreht bei  $37\text{ °C}$  ca. 24 Stunden inkubiert, bis deutlich sichtbare Kolonien gewachsen waren. Es wurden immer beide Platten derjenigen Verdünnungsstufe, in der zwischen 30 und 300 Kolonien entstanden sind, ausgezählt.

Der Durchschnitt der Koloniezahlen beider Platten multipliziert mit dem Kehrwert der Verdünnungsstufe multipliziert mit 10 ergibt die Keimzahl pro ml im Bebrütungsansatz (3 oder 4):

$$\text{Keimzahl/ml} = \frac{(\text{KoloniezahlPlatte1} + \text{KoloniezahlPlatte2})}{2} * \frac{1}{10^x} * 10,$$

wobei x die Potenz der Verdünnungsstufe ist.

### **3.4.3 Überprüfung weiterer Salmonellenstämmen auf ihr Wachstumsverhalten in RV bei $42\text{ °C}$**

#### **3.4.3.1 Keimzahlschätzung während der Bebrütungsperiode**

Ziel dieses Versuches war, das Wachstum der übrigen 23 Salmonellenstämmen des NRL-SALM und der 42 Stämme des ZFF in RV bei  $42\text{ °C}$  zu untersuchen.

Dazu wurde von jedem Stamm eine Suspension in RV angefertigt, wie in Abschnitt 3.4.2.4 (S. 76) beschrieben ist. Aus RV3 und RV4 wurden jeweils  $100\text{ }\mu\text{l}$  auf zwei N1-Platten ausgespatelt, um die Ausgangskeimzahl festzustellen. Dann wurden RV3 und RV4 bei  $42\text{ °C}$  inkubiert und nach 12, 24 und 48 Stunden die Keimzahl bestimmt. Dazu wurden wiederum Zehnfachverdünnungsreihen in steriler, physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Aus diesen wurden jeweils  $100\text{ }\mu\text{l}$  in Reagenzglaschen mit 5 ml Nährbouillon pipettiert. Die beimpften Reagenzgläser wurden 24 Stunden bei  $37\text{ °C}$  inkubiert, dann wurden sie auf Trübung hin untersucht, welche Bakterienwachstum anzeigt; auch hier wurde stets ein Doppelansatz angelegt. Als positiv wurden Verdünnungsstufen gewertet, in denen mindestens ein Röhrchen Trübung aufwies.



### 3.4.3.2 Vergleich der Zählmethode mit der Schätzmethode

Stichprobenweise wurde verglichen, ob die auf diese Weise erhaltene Keimzahl größenordnungsmäßig der beim Spatelverfahren erhaltenen Keimzahl entspricht.

Zusätzlich wurde stichprobenartig nach Inkubation der beimpften Nährbouillon-Röhrchen auf einem festen Nährboden ausgestrichen, um die Reinheit des Salmonellenstammes zu überprüfen und eine Kontamination auszuschließen.

Die Berechnung der Keimzahl erfolgte nach der Formel:

$$\text{Keimzahl/ml} = \frac{1}{10^x} * 10,$$

wobei x die Potenz derjenigen Verdünnungsstufe ist, in der noch mindestens ein Röhrchen Trübung aufweist.

### 3.4.4 Einfluss der Begleitflora auf Wachstum und Isolierbarkeit von Salmonellen

#### 3.4.4.1 Vergleich der Anzahl der Salmonellenkolonien auf N1, BPLS und RAMBACH

Da in den vorangegangenen Untersuchungen eine geeignete Temperatur für Bebrütung und Wachstum von Reptiliensalmonellen in Reinkultur gesucht wurde, sollte nun überprüft werden, ob und in wie weit das Wachstum von Begleitflora bei dieser Temperatur gehemmt wird und wie sich ihr Vorhandensein auf das Wachstum und die Isolierbarkeit von Salmonellen auswirkt.

Dazu musste zunächst verglichen werden, ob sich beim Ausspateln einer Salmonellensuspension auf N1, BPLS- und RAMBACH-Agar die gleiche Anzahl an Kolonien bildet, oder ob auf den Salmonellendifferenzierungsnährböden durch eventuelle Hemmung einiger Keime weniger Kolonien wachsen als auf N1. In diesem Experiment ist die Verwendung eines Differenzierungsnährbodens nötig, um Salmonellen von Begleitflora unterscheiden zu können. Dafür wurden BPLS- und RAMBACH-Agar gewählt.

Von dem Versuchsstamm wurde eine Keimsuspension hergestellt, wie in Abschnitt 3.4.2.4 (S. 76) beschrieben ist, und jeweils 100 µl auf zwei N1-, BPLS- und RAMBACH-Agarplatten



ausgespatelt und gezählt. Nach 12- und 24-stündiger Bebrütung dieser Ansätze wurden ebenfalls Keimzählungen auf den drei Nährböden vorgenommen und verglichen.

#### **3.4.4.2 Verwendeter Salmonellenstamm**

Als Begleitflora diente die natürliche Darmflora in nativem Kot von zwei Griechischen Landschildkröten, *Testudo hermanni*. Entsprechend wurde hier als Versuchsstamm ein Salmonellenisolat aus dem Kot einer Schildkröte eingesetzt.

Ausgewählt wurde der Salmonellenstamm ZFF 1230/99. Er wurde aus dem Kot einer Schildkröte der Art *Agrionemys horsfieldii* isoliert und ist ein Vertreter der Subspezies II; er hat die Antigenformel 13,22:z<sub>29</sub>:1,5.

#### **3.4.4.3 Verwendete Selektivanreicherungsmedien**

RV und S wurden als Selektivanreicherungsmedien verwendet. RV wurde bei 41 °C, S bei 37 °C 48 Stunden lang inkubiert.

#### **3.4.4.4 Beimpfung mit Salmonellen und Begleitflora**

Von dem Versuchsstamm ZFF 1230/99 wurde eine Salmonellensuspension (siehe 3.4.2.4, S. 76) in RV und S im Dreifachansatz angefertigt und die Keimzahl durch Ausspateln auf N1-, BPLS- und RAMBACH-Agar festgestellt.

Von jedem Ansatz, also von RV3, RV4, S3 und S4, wurden zwei Röhrchen mit frischen Fäzes von zwei Schildkröten, die vorher salmonellennegativ getestet worden waren, beimpft, wie in Abschnitt 3.6.4.2 (S. 83) beschrieben wird. Das dritte Röhrchen wurde als Kontrolle ohne Begleitflora mitgeführt. Ein viertes Reagenzglas wurde mit Begleitflora ohne Salmonellen beimpft, dies diente ebenfalls als Kontrolle.

Zu Beginn des Versuchs zum Zeitpunkt 0 und nach 12, 24 und 48 Stunden wurde eine Keimzählung vorgenommen, indem die mit Fäzes und Salmonellen beimpften Röhrchen auf BPLS- und RAMBACH-Agar, die Salmonellen-Reinkulturen auf N1 ausgespatelt wurden. Die Begleitflora ohne Salmonellen wurde auf BPLS ausgespatelt.



### **3.5 ERMITTLUNG GEEIGNETER SELEKTIV- UND DIFFERENZIERUNGSNÄHRBÖDEN**

86 Salmonellenstämme aus Reptilien (24 vom NRL-SALM, 42 vom ZFF und 20, die bei der vorliegenden Untersuchung aus 167 Schildkröten und zwei Echsen isoliert wurden) wurden auf neun verschiedenen Salmonellen-Selektiv- und Differenzierungsnährböden (siehe 3.1.2.2, S. 70) in Reinkultur ausgestrichen und untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, ob die Koloniemorphologie für Salmonellen typisch ist und ob diese Kolonien bei einer Routineuntersuchung verdächtig erscheinen und erkannt würden. Zusätzlich wurde die Wachstumsstärke hinsichtlich der Koloniegröße und -anzahl beurteilt.

Jeder Salmonellenstamm wurde auf einer ganzen Platte des jeweiligen Nährbodens im Drei-ösenausstrich aufgeimpft. Die Platten wurden umgedreht bei 37 °C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden untersucht.

### **3.6 PROBENNAHME UND KOTUNTERSUCHUNG**

#### **3.6.1 Herkunft der untersuchten Kotproben**

##### **3.6.1.1 Schildkrötenbestände**

Die untersuchten Schildkröten stammten aus mehreren Beständen im Münchner Raum, vornehmlich aus Privatbesitz. Eingeschlossen in die Untersuchung war eine Zoohandlung mit zwei nach Aussage des Besitzers strikt getrennten Beständen an Verkaufstieren (Bestand B9 in Tab. 10) und Privattieren (Bestand B10 in Tab. 10), die daher auch getrennt aufgeführt werden. Die Bestandsgröße reichte von zwei bis über 30 Schildkröten und setzte sich zumeist sowohl aus Wildfängen als auch aus eigenen und von Händlern und Bekannten stammenden Nachzuchtieren zusammen. Von mehreren Tieren ist die Herkunft nicht bekannt. Auch einige Einzeltiere wurden erfasst. Insgesamt wurden Kotproben von 167 Schildkröten einmalig untersucht. Eine genaue Aufstellung ist aus Tabelle 10 ersichtlich.



Alle untersuchten Tiere waren vorberichtlich und auch in der klinischen Untersuchung gesund. Es handelte sich um Landschildkröten verschiedener Arten, die systematisch Einteilung ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

### **3.6.1.2 Kotproben von Echsen**

Zusätzlich wurden zwei Kotproben von Echsen mituntersucht, die in Bestand B 10 mit Schildkröten vergesellschaftet waren. Es handelte sich dabei um einen Hardun, *Agama stellio*, und um drei Madagassische Schildechsen, *Tracheloptychus madagascariensis*. Die Kotproben von den Schildechsen konnten den einzelnen Tieren nicht genau zugeordnet werden, weshalb sie als Sammelprobe untersucht wurden.

### **3.6.2 Probennahme**

Nach einer kurzen Anamnese, in der Herkunft, Alter, Haltung, Besitzdauer und vorangegangene Behandlungen mit Antiparasitika und Antibiotika erfragt wurden, fand eine Allgemeinuntersuchung der Schildkröten statt; dabei wurden Verhalten, Bewegung, Ernährungszustand, Panzer, Augen, Haut und Schleimhaut beurteilt und Gewicht und – soweit möglich – Geschlecht protokolliert.

Die Proben wurden im Juli und August 2002 gewonnen. Dazu wurden die Schildkröten in Plastikwannen mit lauwarmem Wasser gesetzt, wodurch der Kotabsatz stimuliert wird. Die Fäzes wurden in sauberen Plastikdöschen aufgefangen. Bei den meisten Beständen wurde die Probennahme durch die Untersucherin vorgenommen, in einigen Fällen übernahmen dies die Besitzer. Die Methode war dann jedoch die gleiche. Es war nicht immer möglich, von allen Tieren eines Bestandes Kot zu gewinnen, aber doch von den meisten.

Insgesamt wurde von 167 Schildkröten einmalig eine Kotprobe untersucht; bei drei Schildkröten bestand zudem die Möglichkeit, ca. drei Wochen nach der ersten Untersuchung eine zweite Kotprobe zu untersuchen.

Die Fäzesproben der mituntersuchten Echsen wurden, nachdem der Kotabsatz zufällig beobachtet wurde, direkt aus dem Terrarium entnommen.



**Tab. 10:** Untersuchte Schildkröten, nach Tierart, Herkunft und Bestand getrennt aufgelistet

| Tierart<br>Herkunft <sup>1</sup> | A. h. |   | A. r. |   | G. e. |   | G. p. |   | G. s. |   | K. b. |   | K. h. |    | P. a. |    | T. g. |    | T. h. |    |   | T. k. |   | T. m. |   | gesamt |     |    |    |
|----------------------------------|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|----|-------|----|-------|----|-------|----|---|-------|---|-------|---|--------|-----|----|----|
|                                  | W     | U | W     | Z | W     | Z | U     | Z | W     | Z | W     | Z | W     | Z  | W     | Z  | W     | U  | Z     | W  | U | Z     | W | Z     | W | U      | Z   |    |    |
| B 1                              |       | 1 |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    |       |    |       |    | 20    |    |   |       |   |       |   |        | 21  |    |    |
| B 2                              | 2     |   |       |   |       |   | 2     |   |       |   |       | 2 |       |    | 1     | 1  |       | 1  |       | 1  |   |       |   |       | 1 | 6      |     | 5  |    |
| B 3                              |       |   |       |   |       |   |       |   | 2     |   |       |   |       |    |       |    |       |    |       | 13 |   |       |   |       | 2 |        |     | 17 |    |
| B 4                              |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    |       | 2  |       |    |       | 3  | 7 |       | 3 |       |   |        | 3   | 12 |    |
| B 5                              |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    |       |    | 3     | 1  |       |    |   |       | 1 |       |   | 4      |     | 2  |    |
| B 6                              |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    |       |    |       |    | 6     | 16 |   |       |   |       |   | 6      |     | 16 |    |
| B 7                              |       |   | 6     |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    | 4     |    |       |    | 3     | 1  | 3 | 4     | 5 | 4     |   | 21     |     | 9  |    |
| B 8                              |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    |       |    |       |    | 2     |    |   |       |   |       |   | 2      |     |    |    |
| B 9                              |       |   |       |   |       |   | 1     |   |       |   |       | 3 |       |    |       |    |       |    |       |    |   | 2     |   |       |   |        | 9   |    | 15 |
| B10                              |       | 5 |       |   |       |   |       |   |       |   |       |   |       |    | 6     | 3  | 8     |    |       |    |   |       |   |       |   | 14     | 5   | 3  |    |
| ET                               |       | 1 |       |   |       | 1 | 1     |   |       |   |       |   |       |    |       |    |       |    |       | 2  |   |       |   |       |   |        | 5   | 1  |    |
| Summe                            | 2     | 7 | 6     |   | 1     | 1 | 3     |   | 2     |   | 3     | 2 |       | 10 | 5     | 12 | 12    | 12 | 23    | 41 | 3 | 7     | 6 | 16    |   | 53     | 34  | 80 |    |
| gesamt                           |       | 9 |       | 6 |       | 1 |       | 4 |       | 2 |       | 3 |       | 2  |       | 15 |       | 15 |       | 78 |   | 10    |   | 22    |   |        | 167 |    |    |

**Abkürzungen:** B: Bestand; ET: Einzeltiere; W: Wildfang; Z: Nachzucht; U: Herkunft unbekannt, sehr wahrscheinlich Wildfang; <sup>1</sup>:Angaben über W, U und Z beruhen auf Aussagen der Besitzer; A. h.: *Agrionemys horsfieldii*; A. r.: *Astrochelys radiata*; G. e.: *Geochelone elegans*; G. p.: *Geochelone pardalis*; G. s.: *Geochelone sulcata*; K. b.: *Kinixys belliana*; K. h.: *Kinixys homeana*; P. a.: *Pyxis arachnoides*; T. g.: *Testudo graeca*; T. h.: *Testudo hermanni*; T. k.: *Testudo kleinmanni*; T. m.: *Testudo marginata*

- Ordnung: Testudines (= Chelonia ), rezente Schildkröten
- Unterordnung: Cryptodira, Halsberger
- Familie: Testudinidae, Landschildkröten
- Gattung: *Agrionemys*, Mittelasiatische Vierzehen-Steppenschildkröte
  - Art: *Agrionemys horsfieldii* Gray 1844
- Gattung: *Astrochelys*
  - Art: *Astrochelys radiata*, Strahlenschildkröte
- Gattung: *Geochelone*
  - Art: *Geochelone elegans*, Sternschildkröte
  - Art: *Geochelone pardalis* Bell 1828, Pantherschildkröte
  - Art: *Geochelone sulcata* Miller 1779, Spornschildkröte
- Gattung: *Kinixys*, Gelenkschildkröten
  - Art: *Kinixys belliana*, Glattrand-Gelenkschildkröte
  - Art: *Kinixys homeana*, Stutz-Gelenkschildkröte
- Gattung: *Pyxis*, Spinnenschildkröten
  - Art: *Pyxis arachnoides*, Spinnenschildkröte
- Gattung: *Testudo*, Europäische Landschildkröten
  - Art: *Testudo graeca* L. 1758, Maurische Landschildkröte
  - Art: *Testudo hermanni* Gmelin 1789, Griechische Landschildkröte
  - Art: *Testudo kleinmanni*, Ägyptische Landschildkröte
  - Art: *Testudo marginata* Schoepff 1792, Breitrandenschildkröte

**Abb. 3:** Systematik und Einteilung der untersuchten Landschildkröten gemäß OBST (1988)



### **3.6.3 Aufbewahrung und Transport der Kotproben**

Direkt nach der Probengewinnung wurden die Döschen beschriftet und in einer Transportbox eisgekühlt aufbewahrt, bis die Probennahme abgeschlossen war; anschließend wurden sie ins Labor transportiert, wo die Untersuchung erfolgte. Die Bearbeitung der Proben begann stets am Tag der Probennahme.

### **3.6.4 Untersuchung der Kotproben im Labor**

#### **3.6.4.1 Direktausstrich**

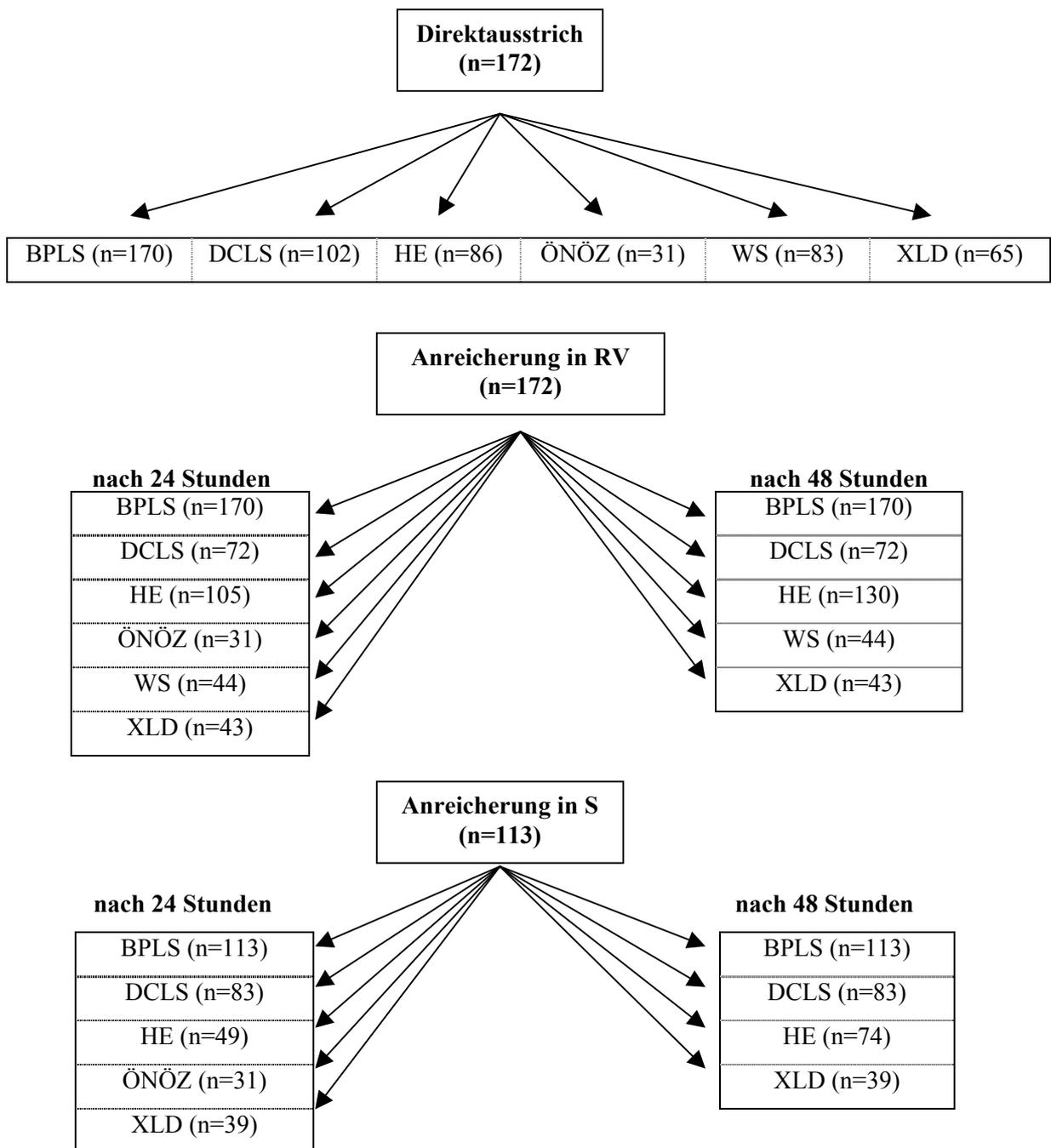
Die Kotproben wurden mit einer sterilen Platinöse auf verschiedenen Nährböden ausgestrichen, dabei wurde ein Verdünnungsausstrich auf einer halben Platte angelegt. Es wurden in variablen Kombinationen immer mindestens drei verschiedene Nährböden beimpft (Abb. 4). Diese wurden 24 und gegebenenfalls 48 Stunden bei 37 °C bebrütet und danach beurteilt.

#### **3.6.4.2 Anreicherung**

Gleichzeitig wurde auch eine Anreicherung in RV und S angelegt, dazu wurde mit einer sterilen Plastiköse ein Quantum Kot, das in der Größe in etwa einem Reiskorn entspricht, in ein Reagenzglas mit 10 ml vorgewärmter RV gegeben, eine etwas größere Menge in 10 ml vorgewärmte S. RV wurde bei 41 °C, S bei 37 °C 48 Stunden bebrütet. Nach 18 bis 24 und 48 Stunden wurde auf feste Nährböden überimpft; auch hier wurden wiederum in verschiedenen Kombinationen immer mindestens drei Nährmedien ausgestrichen. Auch diese Platten wurden nach 24 und eventuell 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C beurteilt.

#### **3.6.4.3 Weitere Differenzierung**

Sowohl von verdächtigen als auch von unverdächtigen Kolonien wurde ein Grampräparat angefertigt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der verwendeten Anreicherungsmedien und Nährböden und deren Kombinationen für die Anzucht der 172 Kotproben

**Abkürzungen:** n: Anzahl der auf jeweiligem Nährboden ausgestrichenen bzw. mit jeweiligem Verfahren angereicherten Proben



Gramnegative Stäbchen wurden mit Oxidase-Teststreifen auf das Vorhandensein von Cytochromoxidase hin geprüft.

Von gramnegativen, oxidasenegativen Kolonien wurde ein API 20 E angelegt, wenn sie in Reinkultur vorlagen; andernfalls wurden sie zuerst subkultiviert, um eine Reinkultur zu gewinnen.

Durch biochemische Differenzierung identifizierte Salmonellen wurden zur Serotypisierung an das NRL-SALM geschickt. Pro Kotprobe wurde nur ein Salmonellenisolat serologisch bestimmt.



## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 ERMITTLUNG EINER GEEIGNETEN INKUBATIONSTEMPERATUR FÜR DIE SELEKTIVANREICHERUNG

#### 4.1.1 Wachstum des Versuchsstammes bei verschiedenen Temperaturen

##### 4.1.1.1 In Abhängigkeit von verschiedenen Anreicherungsmedien

Der Wachstumsverlauf des Salmonellenstammes NRL-SALM 2509 war bei sechs untersuchten Temperaturen in den drei Anreicherungsmedien R, RV und S sehr unterschiedlich.

In fast allen Fällen war bei einer sehr gleichmäßigen Keimeinsaat um die  $10^3$  Keime/ml nach 24 Stunden Bebrütung die Keimvermehrung bei einer Dichte zwischen  $10^8$  und  $10^9$  Keimen/ml abgeschlossen. Diese Keimdichte stellte die maximal erreichbare Keimzahl/ml dar; sie blieb in allen drei Medien bei jeder Temperatur bis über 48 Stunden erhalten; dies wurde in mehreren Versuchen überprüft.

Bei Bebrütung von RV und S bei den mittleren Temperaturen von 32, 35 und 37 °C wurde die maximale Keimdichte von  $10^8$  bis  $10^9$  Keimen/ml schon wesentlich früher erreicht, etwa nach zwölf Stunden. In diesen beiden Selektivanreicherungsmedien war das Keimwachstum bei 42 °C gegenüber allen anderen Temperaturen deutlich verzögert.

Während die Zellvermehrung in R bei 28 °C mit den beiden anderen Selektivanreicherungsmedien sehr konform ging, traten bei allen anderen untersuchten Temperaturen deutliche Wachstumsverzögerungen gegenüber RV und S auf; sehr häufig ging in R der Phase der exponentiellen Vermehrung, d.h. der log-Phase, eine sehr ausgedehnte lag-Phase mit breitem Plateau mit gleich bleibender oder gar abnehmender Keimdichte voraus. Dies ist in Abbildung 7 bei 35 °C besonders deutlich zu sehen. Bei 42 °C war in R keine Zellvermehrung mehr möglich; im Gegenteil, die eingepflichten Bakterienzellen starben ab, und nach ca. zehn Stunden war kein einziges lebensfähiges oder zumindest vermehrungsfähiges, koloniebildendes Bakterium mehr nachzuweisen.



Die Wachstumskurven aller drei Selektivanreicherungsmedien bei der jeweils untersuchten Temperatur sind in den Abbildungen 5-10 dargestellt; die Kurven setzen sich stets aus Mittelwerten mehrerer Anzuchtungen zusammen.

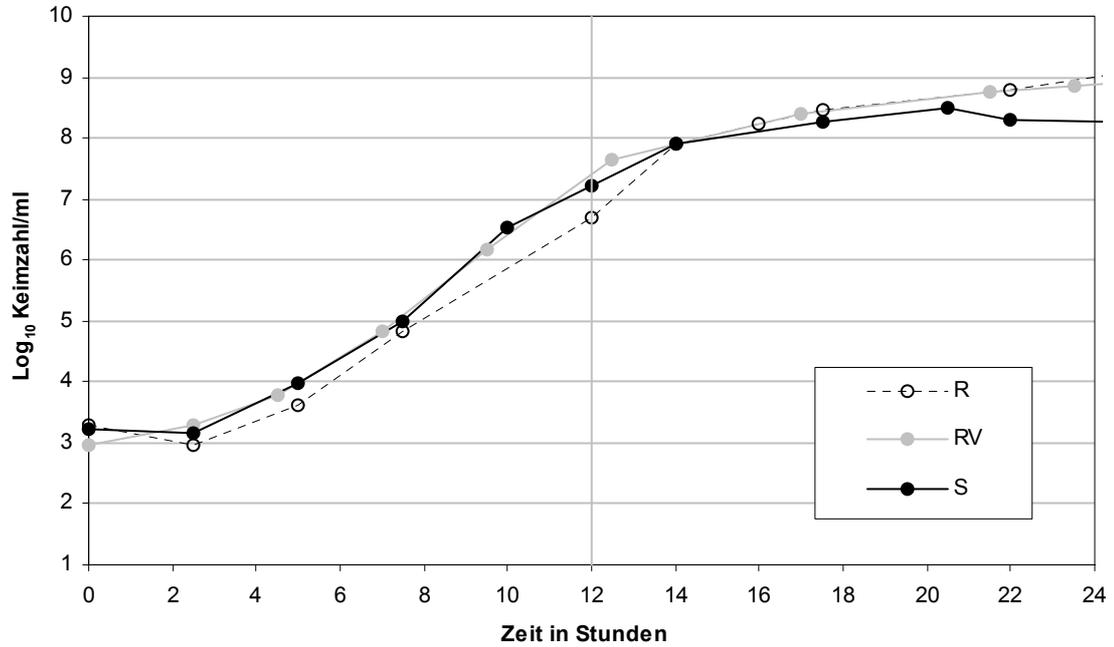


Abb. 5: Wachstum in R, RV und S bei 28 °C

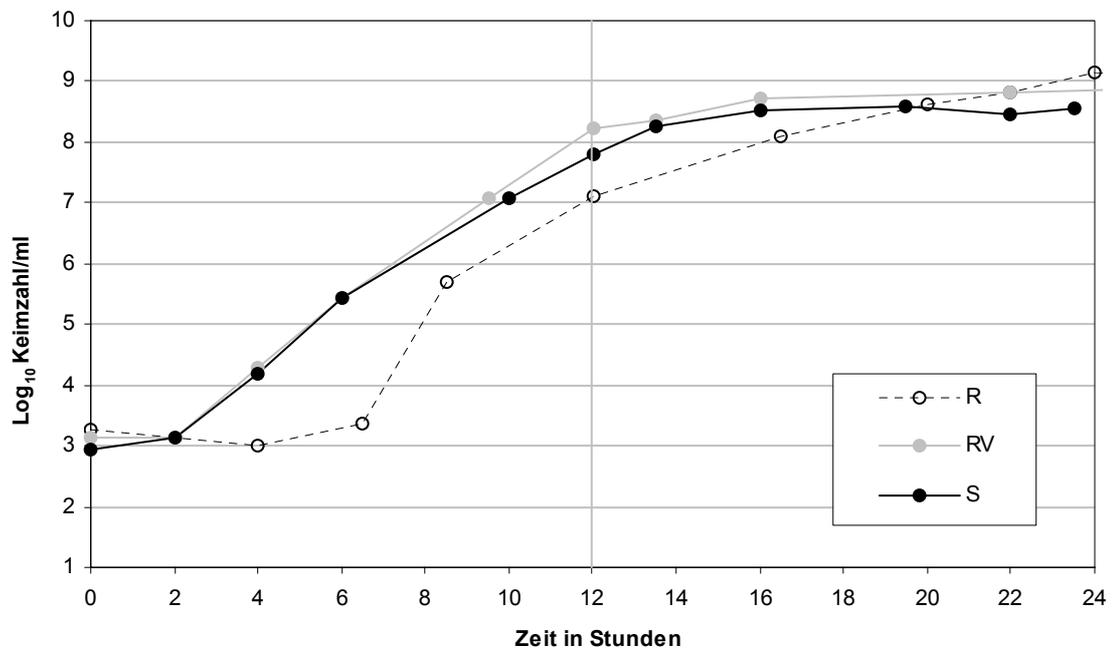


Abb. 6: Wachstum in R, RV und S bei 32 °C

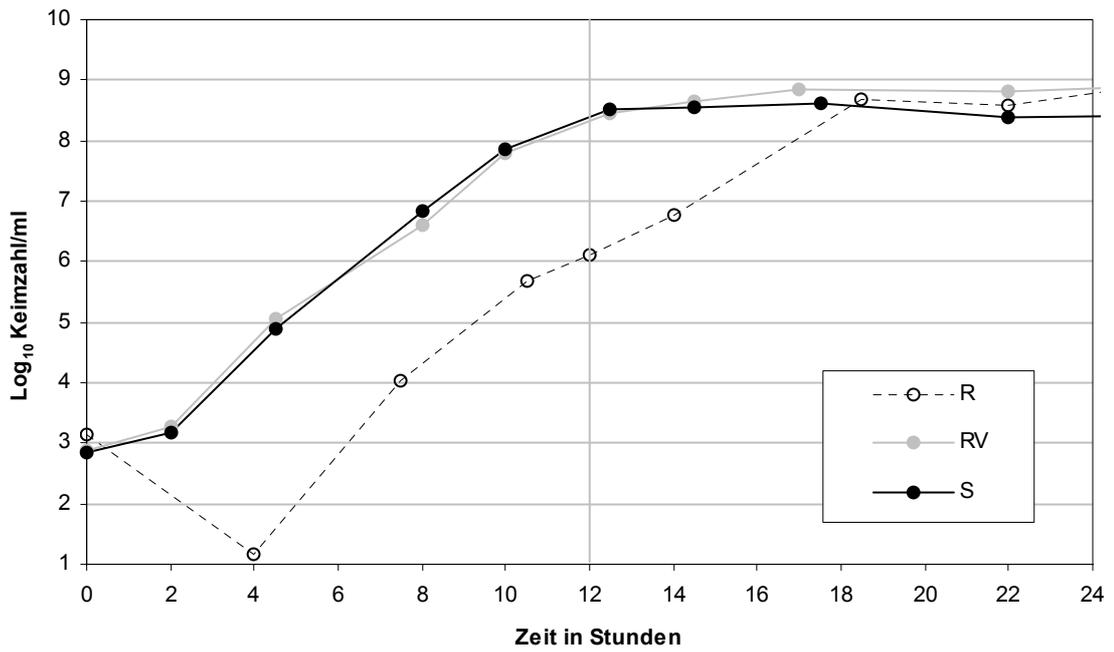


Abb. 7: Wachstum in R, RV und S bei 35 °C

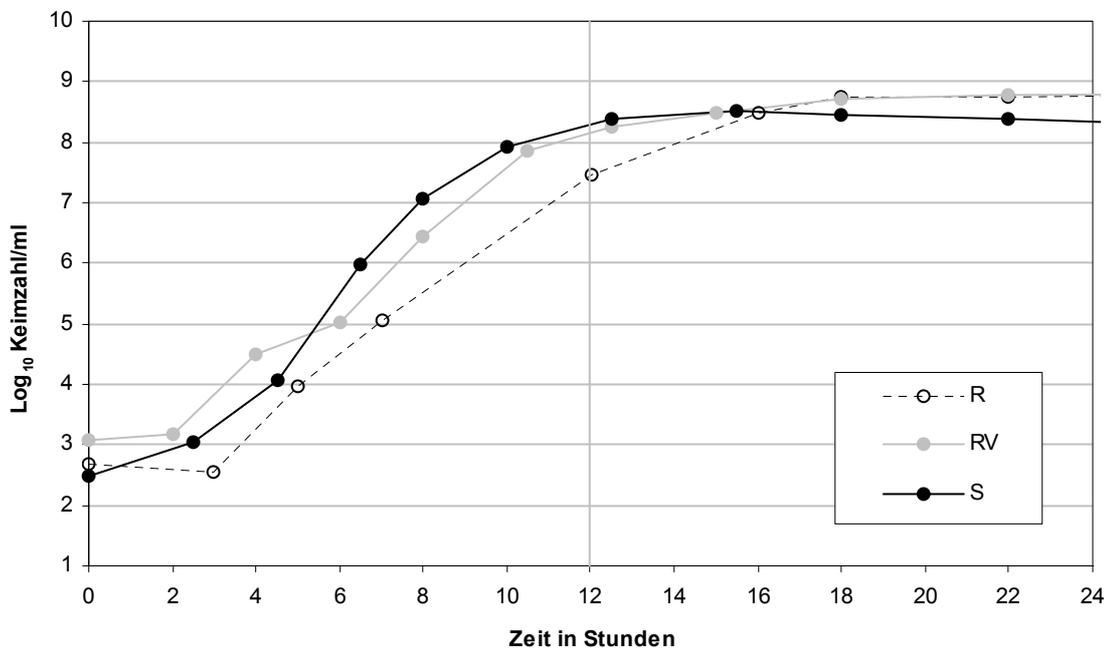


Abb. 8: Wachstum in R, RV und S bei 37 °C

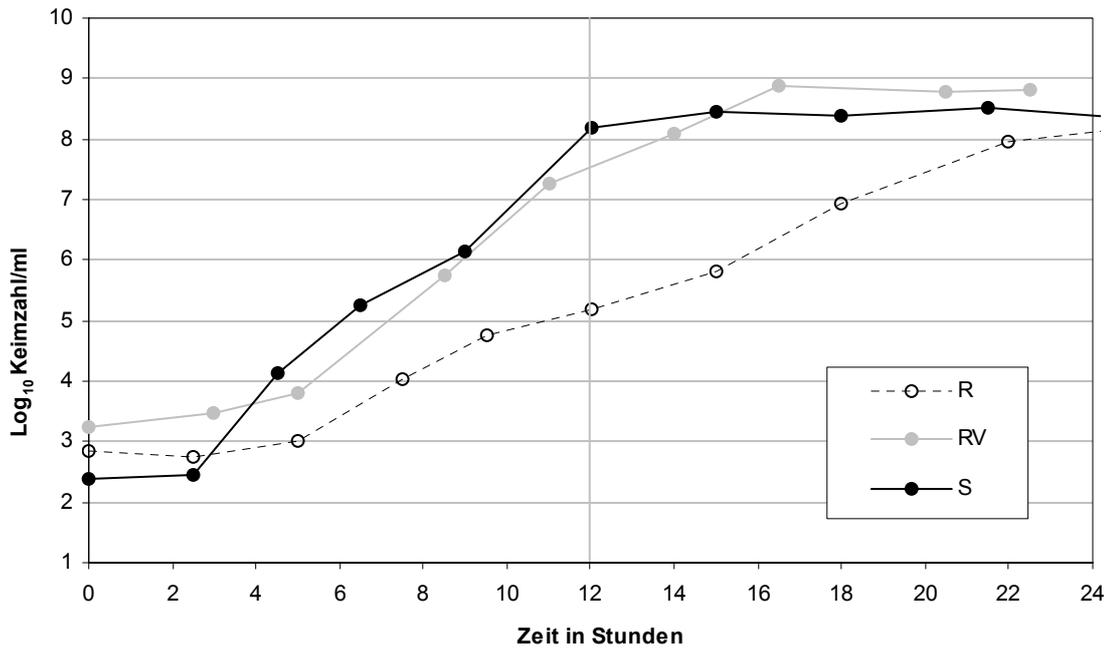


Abb. 9: Wachstum in R, RV und S bei 40 °C

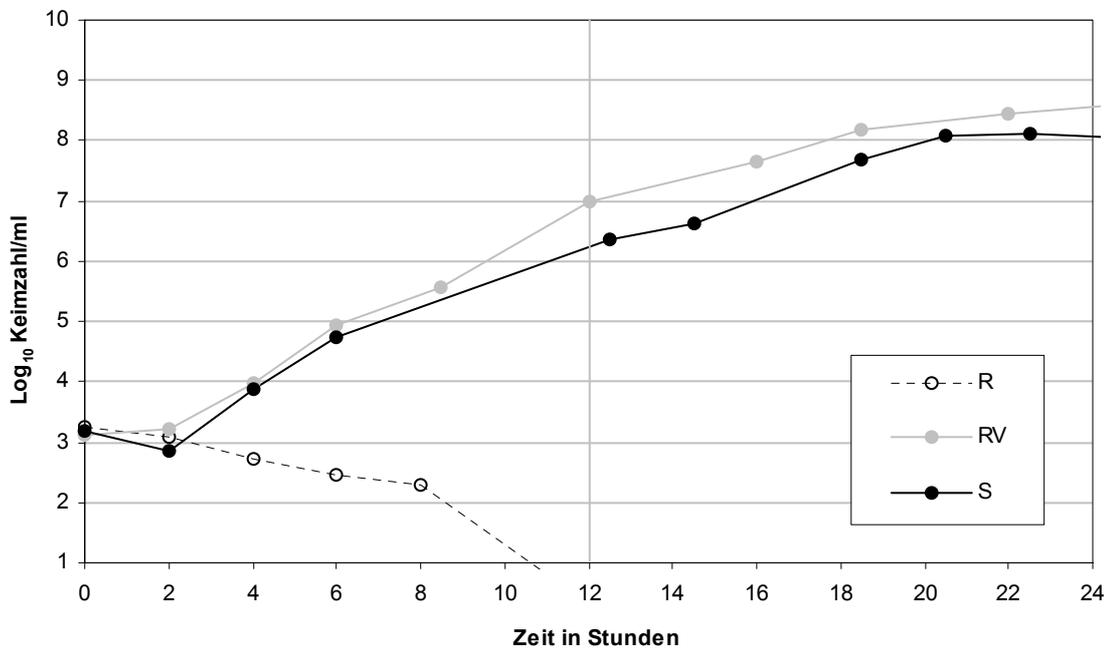


Abb. 10: Wachstum in R, RV und S bei 42 °C



#### 4.1.1.2 Wachstumsvergleich bei verschiedenen Temperaturen

Um den Einfluss der Temperatur noch besser beurteilen zu können, sind in den Abbildungen 11-13 die Wachstumskurven in nur einem Medium bei sechs untersuchten Temperaturen aufgetragen.

Man sieht deutlich, dass die Zellteilung in allen drei Selektivmedien bei 42 °C am langsamsten abläuft. In R findet bei dieser Temperatur kein Wachstum mehr statt (Abb. 11).

Während in RV die Teilungsrate bei den untersuchten Randtemperaturen 28 und 40 °C – die kritische Temperatur von 42 °C wurde ja gerade schon besprochen – etwas niedriger ist als bei den mittleren Temperaturen 32, 35 und 37 °C (Abb. 12), ist in S nur bei 28 °C eine leichte Wachstumsverzögerung zu erkennen; bei 32, 35, 37 und auch 40 °C sind sich die Wachstumskurven in diesem Medium recht ähnlich (Abb. 13).

In R ist das Wachstum des Versuchsstammes bei den Temperaturen von 28 bis 37 °C ziemlich gleichartig; bei 40 °C tritt jedoch schon eine deutliche Verzögerung gegenüber den niedrigeren Temperaturen auf. Die maximale Keimdichte wird in diesem Medium bei allen Temperaturen erst ca. sechs Stunden später erreicht als in den beiden anderen Salmonellen-Selektivanreicherungsmedien. Auch die sehr lange lag-Phase und das Absterben von eingepflichten Keimen vor der Vermehrung in R wird in Abbildung 11 deutlich.

Das Wort „Absterben“ soll an dieser Stelle kurz erläutert werden: Es kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die jeweiligen Bakterien tatsächlich tot sind; es kann nur festgestellt werden, dass sich beim Ausspateln einer entsprechenden Verdünnung auf einer Agarplatte keine Kolonien bilden, die das Vorhandensein mindestens eines vermehrungsfähigen Keimes anzeigen würden (koloniebildende Einheit). Möglicherweise sind jedoch lebensfähige, aber nicht vermehrungsfähige Bakterien anwesend, die mit dieser Methode nicht nachweisbar sind, aber unter günstigeren Bedingungen die Fähigkeit zur Zellvermehrung wiedererlangen können. Der Einfachheit halber wird hier der Ausdruck „Absterben“ verwendet, obwohl er unter Umständen nicht den realen Sachverhalt widerspiegelt.

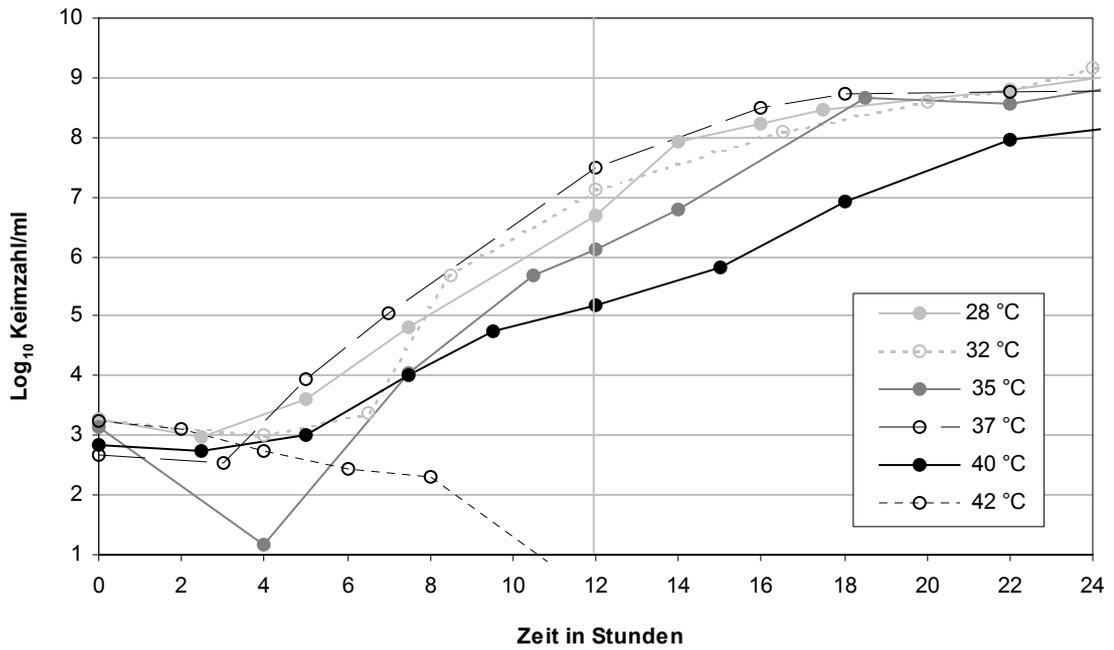


Abb. 11: Wachstum in R bei verschiedenen Temperaturen

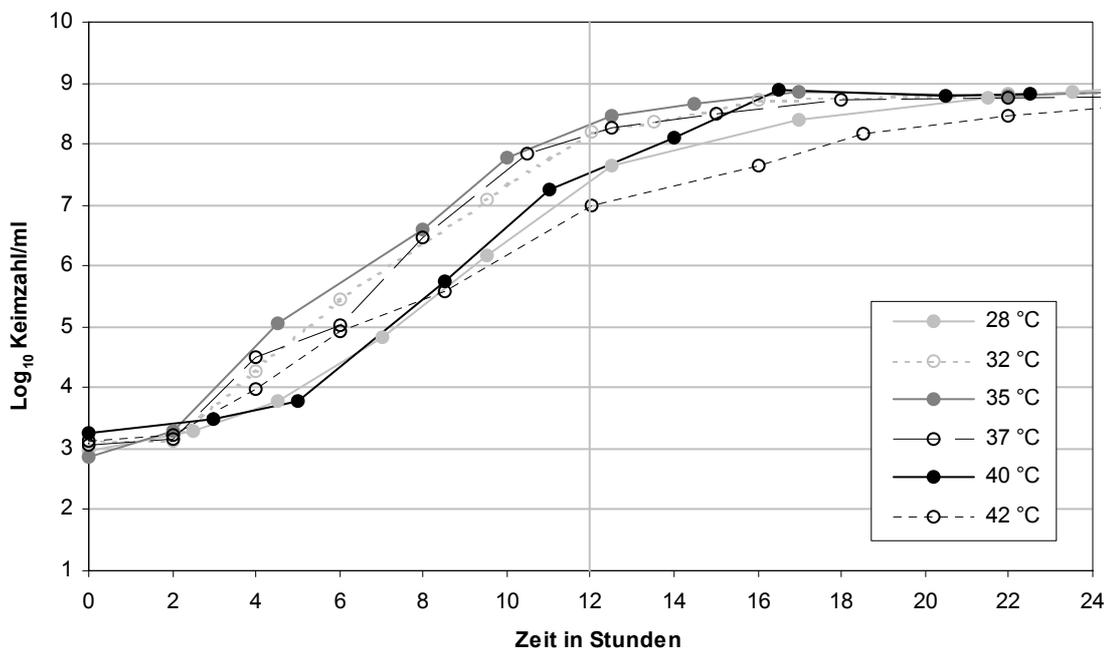
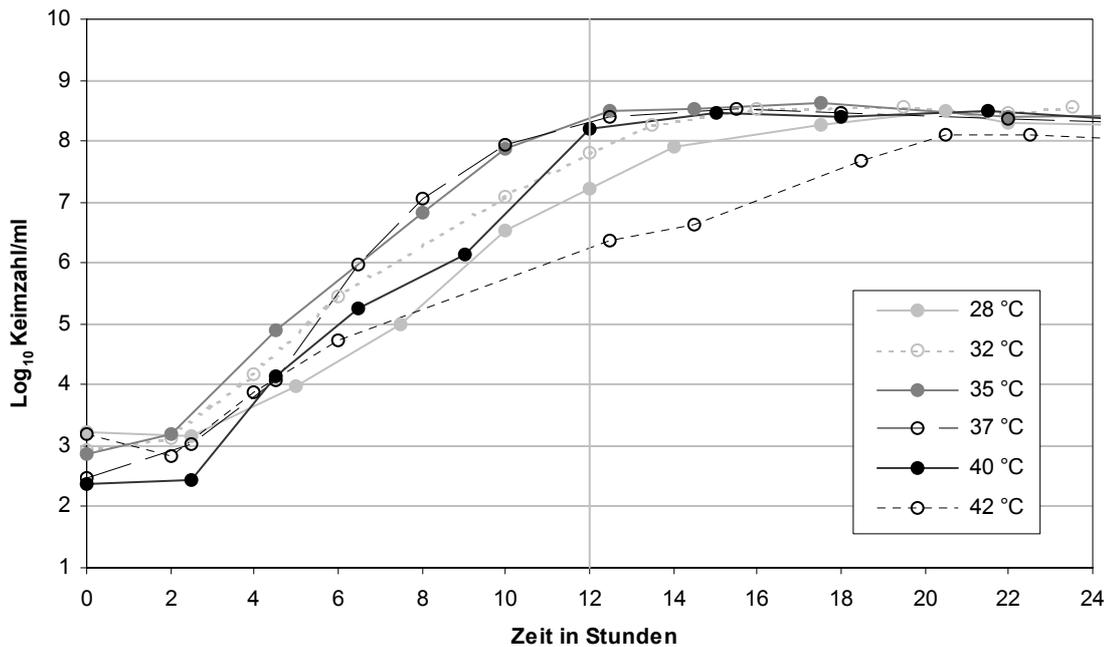


Abb. 12: Wachstum in RV bei verschiedenen Temperaturen



*Abb. 13: Wachstum in S bei verschiedenen Temperaturen*

#### 4.1.1.3 Genauere Betrachtungen zur Anzucht des Versuchstammes in RV bei 42 °C

Der Wachstumsverlauf des Versuchstammes NRL-SALM 2509 zeigte in RV bei 42 °C folgende Besonderheiten: Die erste Versuchsreihe, diesen Salmonellenstamm in RV bei 42 °C anzuzüchten, bestand aus acht Einzelversuchen. Manche Ansätze führten dabei zu einer Keimvermehrung, die in Zeitraum und Größenordnung in etwa im erwarteten Bereich lag; in anderen Ansätzen aber war das Wachstum deutlich verzögert und erreichte auch nach über 30 Stunden nicht die übliche maximale Keimdichte von ca.  $10^8$  Keimen/ml, sondern schwankte zwischen  $10^2$  und  $10^7$ . Teilweise kam es, ähnlich wie in R, zu einem Absterben der inokulierten Bakterien nach einigen Stunden. Die Wachstumskurven dieses Versuches sind in Abbildung 14 dargestellt, wobei jede Kurve den Wachstumsverlauf eines einzelnen Anzuchtversuches beschreibt.

In vier der acht Versuchsansätze überstieg die im Brutschrank erreichte Temperatur 42 °C: Zweimal wurde eine Temperatur von 42,5 °C und zweimal sogar 43 °C gemessen. In den übrigen vier Ansätzen wurde die Temperatur von 42 °C eingehalten. Die divergierenden Wachstumskurven korrelieren jedoch nicht mit dem Überschreiten der gewünschten Temperatur von 42 °C (Abb. 14):

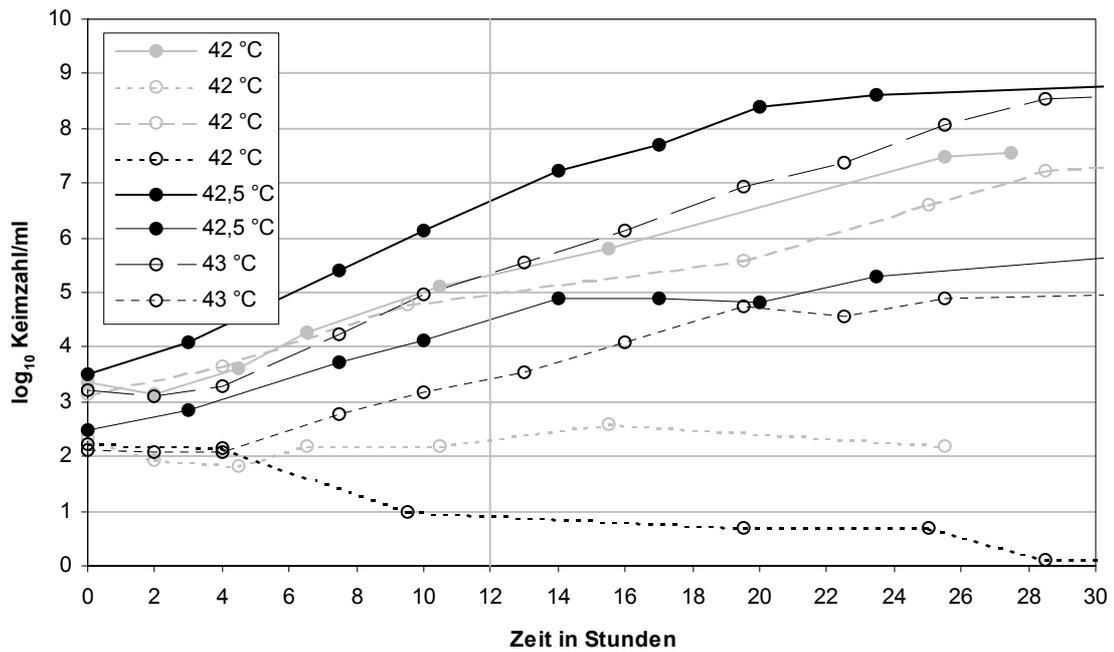


Abb. 14: Wachstum in RV bei Temperaturen um 42 °C

In S konnte in keinem Fall ein Absterben der eingepfunden Keime beobachtet werden, wenn auch die Zellteilungsrate bei 42 °C geringer war als bei niedrigeren Temperaturen.

#### 4.1.2 Wachstumsverhalten weiterer Salmonellenstämmen in RV bei 42 °C

##### 4.1.2.1 Vergleich der zwei verwendeten Methoden zur Bestimmung der Keimzahl

Die Keimdichte während der Anzucht von weiteren 65 Salmonellenstämmen in RV bei 42 °C wurde anhand von Trübung in Röhren mit Nährbouillon geschätzt und nicht mittels Ausplattieren auf Agarplatten gezählt, wie beim Versuchsstamm NRL-SALM 2509 (siehe 3.4.3.1, S. 77).

Ein Vergleich der beiden angewendeten Methoden zur Keimzahlbestimmung ergab eine sehr gute Übereinstimmung.



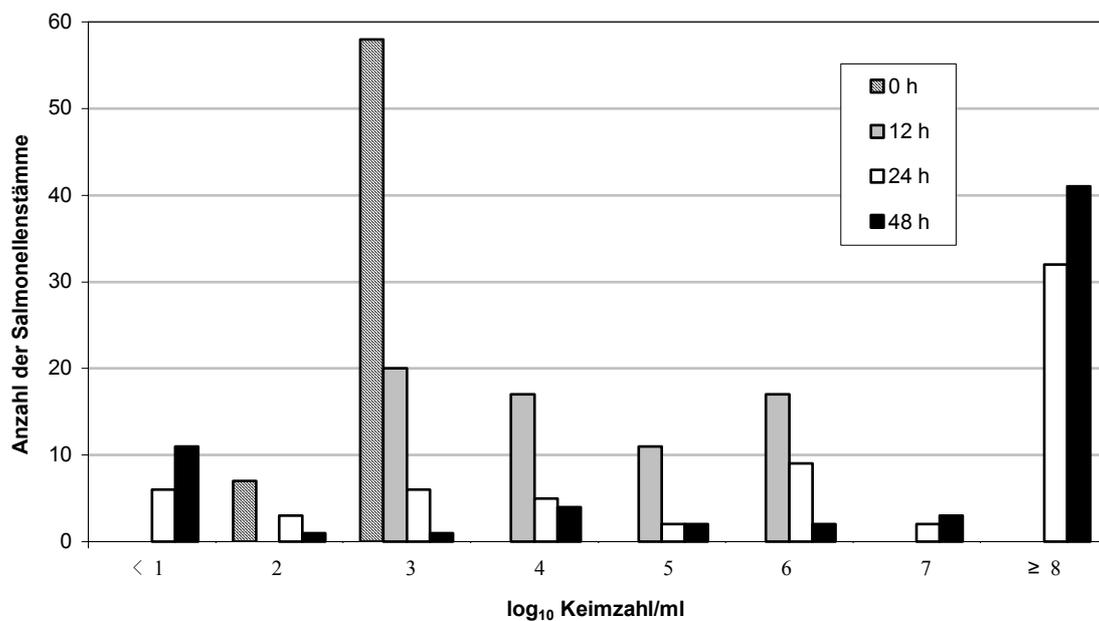
#### 4.1.2.2 Ergebnis des ersten Anzuchtversuches weiterer Salmonellenstämme in RV bei 42 °C

41 der in diesem Experiment getesteten 65 Salmonellenstämme vermehrten sich beim ersten Anzuchtversuch innerhalb von 48 Stunden in RV bei einer Temperatur von 42 °C bis zu der erwarteten Keimdichte von mindestens  $10^8$  Keimen/ml; das entspricht einem Anteil von etwa 63 %. 13 Stämme, 20 %, vermehrten sich innerhalb von 48 Stunden nicht. Die übrigen elf Stämme zeigten ein gemäßigtes Wachstum mit einer Dichte zwischen  $10^4$  und  $10^7$  Keimen/ml.

Die Keimeinsaat variierte zwischen  $9,5 \times 10^1$  und  $3 \times 10^3$  Keimen. Es war kein Zusammenhang zwischen der Ausgangskeimzahl und dem Wachstumsvermögen zu erkennen. Beispielsweise konnte sich der Salmonellenstamm NRL-SALM 872 mit einer Ausgangskeimzahl von nur 95 bereits innerhalb von 24 Stunden auf  $10^8$  Keime/ml vermehren. Dagegen wies der Stamm ZFF 1169/01 bei einer Keimeinsaat von  $2,3 \times 10^3$  nach 24 Stunden noch  $10^3$  Keime/ml und nach 48 Stunden nicht einmal mehr zehn lebensfähige Keime/ml auf.

Bei mehreren Salmonellenstämmen konnte nach 48-stündiger Bebrütung eine maximale Keimdichte von  $10^{10}$  Keimen/ml und mehr festgestellt werden.

In Abbildung 15 ist das Wachstumsvermögen und die Vermehrung aller 65 getesteten Salmonellenstämme in RV bei 42 °C beim ersten Versuch dargestellt:



**Abb. 15:** Wachstum von 65 Salmonellenstämmen bei 42 °C in RV nach 12, 24 und 48 Stunden



#### 4.1.2.3 Subspezieszugehörigkeit der beim ersten Versuch nicht gewachsenen Stämme

Die elf beim ersten Anzuchtversuch nicht gewachsenen Salmonellenstämme sind

- NRL-SALM 148, *S. Subspez. IIIb*,
- NRL-SALM 605, *S. Subspez. IIIb*,
- NRL-SALM 982, *S. Subspez. IIIb*,
- ZFF 1328/98, *S. Subspez. IIIb*,
- ZFF 42/99, *S. Aprad*,
- ZFF 269/99, *S. Subspez. IIIb*,
- ZFF 1484/99, *S. Subspez. IIIb*,
- ZFF 1899/99, *S. Subspez. IIIb*,
- ZFF 148/01, *S. Subspez. IV*,
- ZFF 156/01, *S. Subspez. IV* und
- ZFF 1169/01, *S. Subspez. IIIb*.

Die Salmonellenstämme ZFF 1830/99 und 863/00, beides *S. Subspez. IIIb*, hatten nach 48 Stunden eine Keimdichte von nur  $10^2$  bzw.  $10^3$  Keimen/ml.

#### 4.1.2.4 Wachstumsfähigkeit der getesteten Salmonellenstämme in RV bei 42 °C bei einmaliger Anzucht

Unter den 65 getesteten Salmonellenstämmen gehörten 19, also fast 30 %, der Subspezies IIIb an. Von diesen sind zehn bei Bebrütung in RV bei 42 °C nicht gewachsen, das entspricht über 52 %.

Von den elf Salmonellenstämmen, die sich unter diesen Anzuchtbedingungen nur mäßig vermehrten, waren wiederum vier aus Subspezies IIIb. Je einer gehörte zu IIIa und IV, drei zu I und zwei zu II. Die Subspezies IIIb-Salmonellen waren die Stämme ZFF 1360/99, ZFF 1490/99, ZFF 2374/99 und ZFF 344/01.

Insgesamt vermehrten sich 14 von den 19 getesteten Salmonellenstämmen aus Subspezies IIIb bei 42 °C in RV nicht oder nur schlecht, das sind fast 75 %.

Von allen 17 Subspezies IV-Stämmen vermehrten sich drei nicht oder nur schlecht, das macht einen Anteil von ca. 18 % aus. Einer von 13 Stämmen aus Subspezies I, knapp 8 %, vermehrte sich nicht, drei weitere nur mäßig, das sind ca. 23 %. Auf Anhieb vermehrten sich unter besagten Bedingungen von den sieben Subspezies II-Stämmen und acht Subspezies IIIa-Stämmen jeweils alle außer einem, das sind ca. 14 bzw. 12 %.



#### **4.1.2.5 Wachstumsfähigkeit der Versuchsstämme in RV bei 42 °C nach mehreren Ansätzen**

Nach mehrmaligen Ansätzen, z.T. nach bis zu fünf Wiederholungen, konnte jeder Versuchsstamm bei 42 °C in RV zum Wachsen gebracht werden. Dann wurde stets eine Keimdichte von mindestens  $10^8$  Keimen/ml erreicht.

### **4.1.3 Einfluss der Begleitflora auf das Wachstum von Salmonellen**

#### **4.1.3.1 Vergleich der Anzahl der Salmonellenkolonien auf N1, BPLS und RAMBACH**

Beim Ausplattieren des gleichen Quantums einer Kultur des Versuchstammes zeigte es sich, dass auf dem RAMBACH-Agar regelmäßig ca. 50 % weniger Kolonien wuchsen als auf N1. Auf dem BPLS-Agar bildeten sich ebenfalls weniger Kolonien als auf N1; die maximale Differenz betrug etwa ein Drittel und wurde nur gelegentlich festgestellt. In der Regel betrug die Abweichung ca. 10 %.

#### **4.1.3.2 Koloniezählung von Salmonellen und Begleitflora**

Der Salmonellenstamm ZFF 1230/99, ein Vertreter aus der Subspezies II, aus dem Kot einer Schildkröte der Art *Agrionemys horsfieldii* isoliert, wurde einmalig zusammen mit nativem Kot von zwei salmonellennegativ getesteten Schildkröten in RV bei 41 °C und in S bei 37 °C angezüchtet.

Bei einer sehr geringen Keimeinsaat von nur ca.  $10^1$  Salmonellen/ml vermehrte sich der Versuchsstamm in Anwesenheit von Begleitflora ähnlich wie in Reinkultur auf eine Keimdichte von über  $10^8$  Keimen/ml.

Auch die Menge der inokulierten Begleitflora war extrem gering. Die zum Beimpfungszeitpunkt angegebene Keimzahl 0 (Abb. 17 und 19) bedeutet jedoch nicht, dass keine Begleitkeime in dem Inokulum vorhanden waren. Lediglich beim Ausstrich von 100 µl des Kulturansatzes konnten keine Begleitkeime nachgewiesen werden.



In den Abbildungen 16-19 sind die Wachstumskurven des Salmonellenstammes und der gramnegativen Begleitflora aus Kot von Schildkröte 1 und 2 in RV und S dargestellt. Die Keimzählung wurde zum Zeitpunkt der Beimpfung bei 0 Stunden und nach 12, 24 und 48 Stunden vorgenommen.

Auf den meisten BPLS-Platten konnten Salmonellenkolonien ganz deutlich von Nichtsalmonellen unterschieden werden. Deshalb und aufgrund der in Abschnitt 4.1.3.1 (S. 96) festgestellten verminderten Koloniezahlen auf RAMBACH, die eine Ermittlung der realen Keimdichte in der Kultur nicht zulassen, wurden Keimzählungen von den BPLS-Platten vorgenommen. Diese sind in den Abbildungen 16-19 mit einem Punkt markiert. In einigen Fällen waren die Platten jedoch wegen zu dichten Bewuchses nicht auswertbar; eine Keimzählung war dann nicht möglich, die Punkte sind deshalb nicht angegeben. Zur besseren Übersicht sind an dieser Stelle Hilfslinien eingezeichnet.

#### **4.1.3.3 Wachstumsvermögen von Salmonellen und Begleitflora in RV bei 41 °C**

In RV bei 41 °C erreichte der Versuchsstamm innerhalb von 24 Stunden eine Keimdichte von über  $10^9$  Keimen/ml. Mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 1 wurde diese Keimzahl schon nach 12 Stunden erreicht und mindestens 36 Stunden lang beibehalten (Abb. 16). Mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 2 stieg die Salmonellenzahl deutlich langsamer an, wobei aber auch die eingesetzte Keimzahl noch niedriger war. Nach Erreichen des Maximums von über  $10^9$  Keimen/ml nach 24 Stunden fiel die Zellzahl in diesem Fall nach weiteren 24 Stunden auf  $10^7$  Keime/ml ab (Abb. 17).

Die Menge der eingepfunden Begleitflora war ebenfalls sehr gering; bei Schildkröte 2 konnte zum Ausgangszeitpunkt keine einzige Kolonie von Begleitkeimen im Ausstrich auf BPLS entdeckt werden. Nach 48 Stunden erreichte die Begleitflora bei beiden Schildkröten die gleiche Keimdichte wie die Salmonellen. Nach 12 und 24 Stunden jedoch waren in der Kultur mehr Salmonellen vorhanden als Begleitkeime; bei Schildkröte 1 machte diese Differenz nach 12 Stunden immerhin dreieinhalb Zehnerpotenzen aus; das heißt, dass zu diesem Zeitpunkt in der Kultur  $10^{3,5}$  mal mehr Salmonellen vorhanden waren als Begleitkeime, also mehr als das Tausendfache. Nach 24 Stunden war eine Koloniezählung und -differenzierung dieser Kultur nicht möglich, es kann daher nicht gesagt werden, wie sehr sich zu diesem Zeitpunkt die Begleitflora an die Salmonellenzahl angenähert hat. Nach 48 Stunden jedenfalls ist keine Über-



legenheit der Salmonellen gegenüber der Begleitflora mehr festzustellen, auch diese hat eine Keimdichte von  $10^9$  Keimen/ml erreicht (Abb. 16).

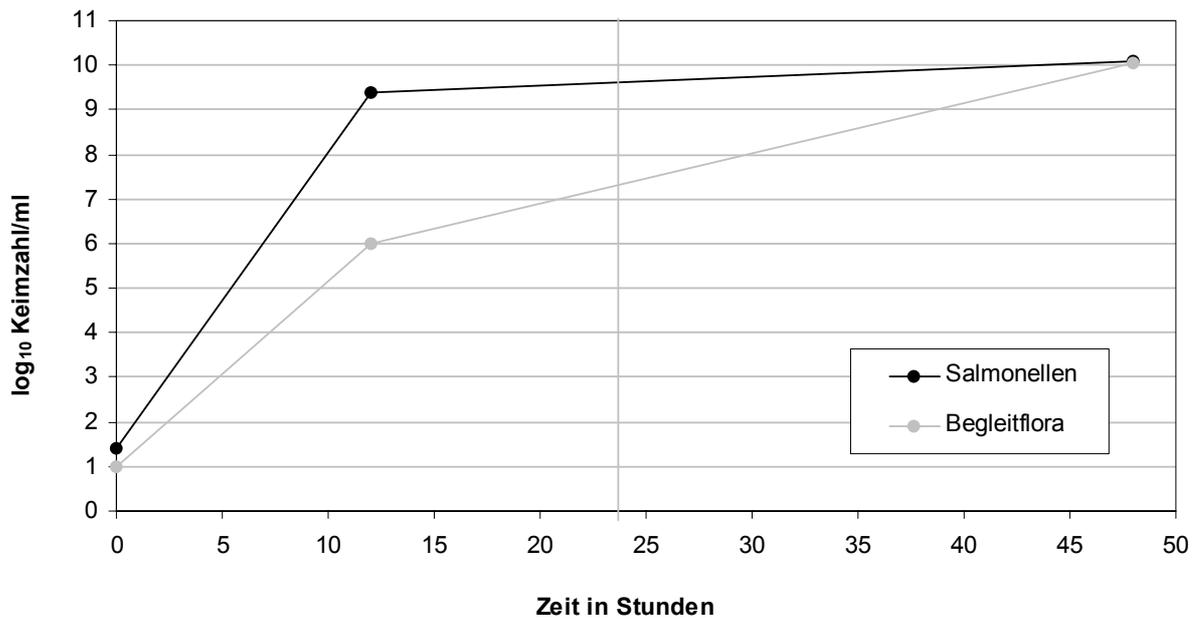
Bei Begleitflora aus Kot von Schildkröte 2 sind die Verhältnisse prinzipiell ähnlich, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Nach 12 Stunden sind etwa zehnmal, nach 24 Stunden ungefähr hundertmal mehr Salmonellen in der Kultur zu zählen als Begleitkeime. Nach 48 Stunden sind fast gleich viele Salmonellen wie Begleitkeime – letztere sogar ein wenig mehr – vorhanden, wobei das Niveau der Begleitflora fast konstant blieb, die Salmonellenzahl – wie gesagt – abgenommen hat (Abb. 17).

#### **4.1.3.4 Wachstumsvermögen von Salmonellen und Begleitflora in S bei 37 °C**

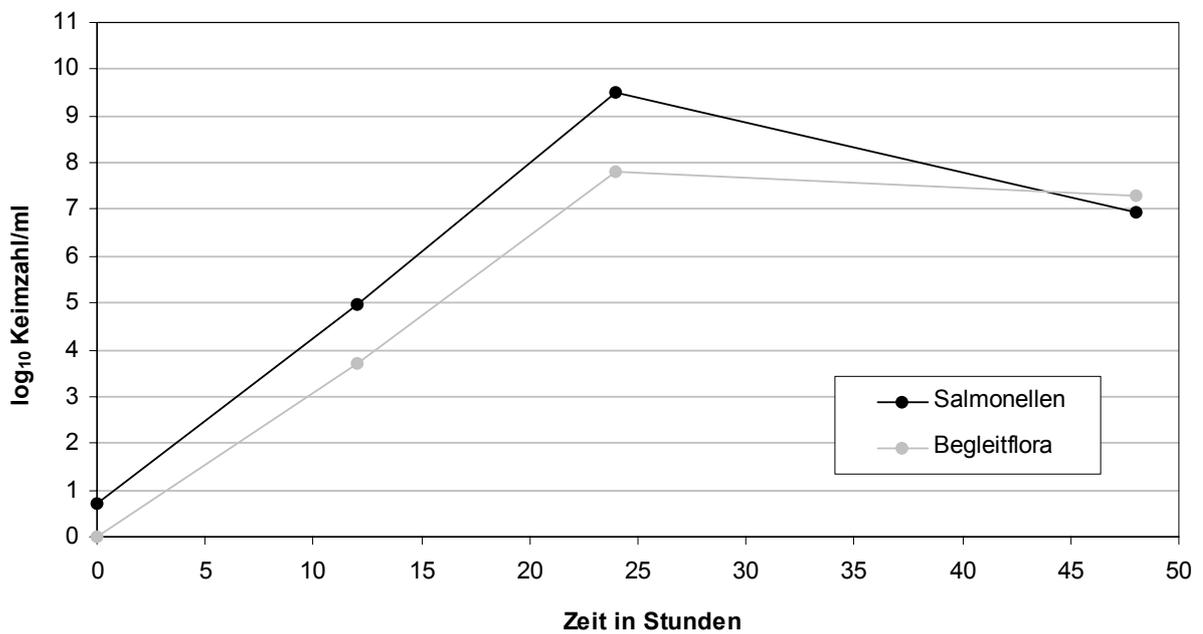
In S erreichte der Salmonellenstamm ZFF 1230/99 in beiden Fällen bereits nach 12 Stunden seine maximale Keimdichte, obwohl auch hier die Salmonelleneinsaat bei Kot von Schildkröte 2 nur ein Zehntel der Menge war, die für Kot von Schildkröte 1 eingesetzt wurde. Während nach 12 Stunden bei Schildkröte 1 über zehnmal mehr Salmonellen in der Kultur vorliegen als Begleitkeime (Abb. 18), hat die Begleitflora in Kot von Schildkröte 2 hier bereits die Salmonellen überwuchert; es sind knapp zehnmal mehr Begleitkeime vorhanden als Salmonellen. Diese mengenmäßige Überlegenheit steigt nach 24 und 48 Stunden auf das 15- bzw. fast 1000-fache an. Dabei fällt auf, dass die Keimdichte der Salmonellen nach Erreichen des Maximums von  $10^8$  Keimen/ml kontinuierlich leicht abnimmt, die der Begleitflora dagegen noch zunimmt (Abb. 19). Die gleiche Beobachtung kann auch bei Schildkröte 1 gemacht werden; die Salmonellenzahl sinkt nach 48 Stunden um mehr als zwei Zehnerpotenzen ab, die Begleitflora legt ca. eine Zehnerpotenz zu, am Ende sind hundertmal mehr Begleitkeime in der Kultur vorhanden als Salmonellen; auch hier war nach 24 Stunden eine Keimzählung nicht möglich.

#### **4.1.3.5 Identifikation der Begleitflora**

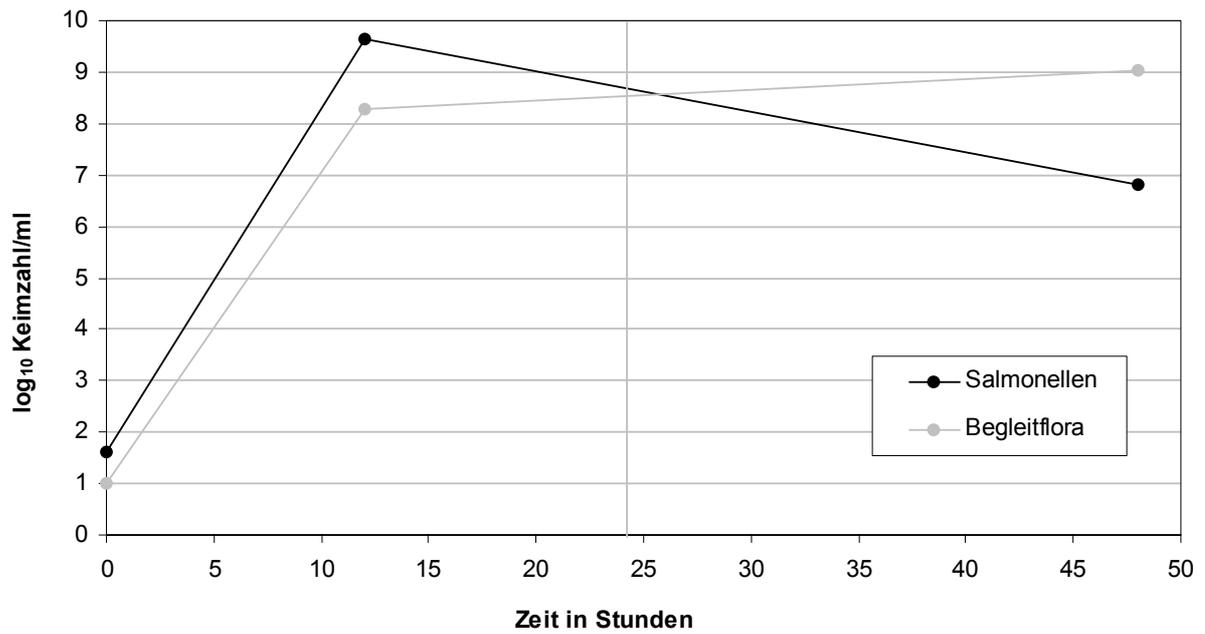
Die Zusammensetzung der gramnegativen Begleitflora im Kot der zwei Schildkröten wurde zu Beginn des Kontaminationsversuches im Direktausstrich auf BPLS bestimmt und nach Bebrütung in RV und S stichprobenartig überprüft.



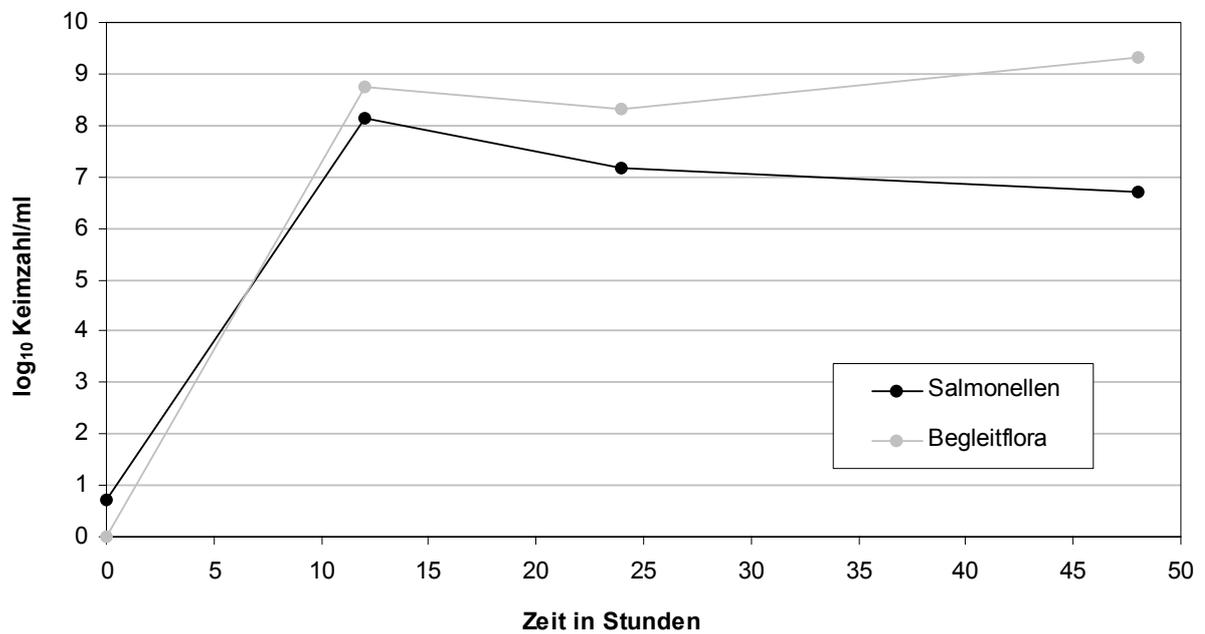
*Abb. 16: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 1 in RV bei 41 °C*



*Abb. 17: Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 2 in RV bei 41 °C*



**Abb. 18:** Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 1 in **S** bei 37 °C



**Abb. 19:** Wachstum des Salmonellenstammes ZFF 1230/99 mit Begleitflora aus Kot von Schildkröte 2 in **S** bei 37 °C



Bei Schildkröte 1 wurde im Direktausstrich geringgradiges Wachstum von *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* 2, *Enterobacter amnigenus* und *Enterobacter cloacae* festgestellt.

Bei Schildkröte 2 wurde im Direktausstrich nur geringgradiges Wachstum von *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* nachgewiesen.

Nach Bebrütung in den Selektivanreicherungsmedien wurde bei beiden Schildkröten sowohl in RV als auch in S *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* identifiziert.

Aus den vorangegangenen Experimenten lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Temperaturen im Bereich von 35 bis 37 °C das Temperaturoptimum für die Vermehrung des Versuchsstammes NRL-SALM 2509 in den Selektivanreicherungsmedien RV und S darstellen. Eine Inkubationstemperatur von 42 °C bewirkt eine langsamere Wachstumsrate.

In R sterben inokulierte Salmonellen bei 42 °C nach kurzer Zeit ab, in RV kann sich vor allem ein Großteil der Subspezies IIIb-Salmonellen bei dieser Temperatur nicht vermehren. In S traten bei keiner Temperatur Wachstumsschwierigkeiten auf.

Bei guter und zuverlässiger Vermehrung des Versuchsstammes ZFF 1230/99 hemmt RV bei 41 °C die untersuchte Begleitflora in den ersten 24 Stunden stärker als S bei 37 °C; darüber hinaus hält RV bei 41 °C die erreichte Populationsdichte der Salmonellen über 48 Stunden hinweg besser konstant als S bei 37 °C.

## **4.2 ERMITTLUNG GEEIGNETER SELEKTIV- UND DIFFERENZIERUNGSNÄHRBÖDEN**

### **4.2.1 Koloniemorphologie von Salmonellenreinkulturen auf verschiedenen Nährböden**

#### **4.2.1.1 Unbeimpfte Nährböden**

Das Aussehen der neun unbeimpften Nährböden ist in Tabelle 11 beschrieben.



#### **4.2.1.2 Koloniemorphologie und Aussehen der Nährböden bei Salmonellen mit „typischer“ Kolonienmorphologie**

##### **Koloniemorphologie und Nährböden nach 24 Stunden**

Ebenfalls aus Tabelle 11 zu entnehmen ist das Aussehen der mit „typischen“ Salmonellen beimpften Nährböden und die Morphologie typisch wachsender Salmonellenkolonien auf den einzelnen Nährböden nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 C°.

Auffällig war, dass auf dem DCLS- und SS-Agar deutlich kleinere Kolonien entstanden als auf allen anderen untersuchten Nährböden; die Kolonien auf DCLS und SS erreichten eine Größe von etwa einem Millimeter Durchmesser. Auf den übrigen Nährböden waren die Kolonien immer mindestens doppelt so groß.

##### **Unterschiedliches Anwachsen der Salmonellenstämme nach 24 Stunden in Abhängigkeit vom Nährboden (Wachstumsstärke)**

Auch die Wachstumsstärke von Salmonellen auf den beiden Nährböden DCLS und SS war – bei gleichartiger Beimpfung und Bebrütung – generell deutlich schwächer ausgeprägt als auf den anderen Nährböden. Oft wuchsen nur im ersten Drittel eines Drei-Ösen-Ausstriches Kolonien; auf allen anderen Nährböden dagegen entstanden erst am Ende des zweiten oder im dritten Ausstrich Einzelkolonien, während sich im ersten Ausstrich ein dichter Bakterienrasen gebildet hatte.

Auf WS zeigten typische Salmonellenstämme ein starkes Wachstum, das mindestens dem auf dem BPLS-, HE-, MLCB-, ÖNÖZ-, RAMBACH- und XLD-Agar entsprach.

##### **Nährböden, Koloniemorphologie und Wachstumsstärke nach 48 Stunden**

Nach weiteren 24 Stunden Bebrütung konnten keine wesentlichen Veränderungen bezüglich des Aussehens der Nährböden festgestellt werden.

Die Koloniemorphologie und die Wachstumsstärke blieben gleichfalls relativ unverändert; beginnende Schwärzung auf DCLS, HE, ÖNÖZ und SS war z.T. etwas verstärkt.

Einzelkolonien waren nach 48 Stunden Bebrütung – wie zu erwarten – größer als nach 24 Stunden. Doch selbst nach dieser verlängerten Inkubationszeit erreichten Kolonien auf DCLS und SS nicht die Größe, die auf den anderen Nährböden schon nach 24 Stunden entstand.

**Tab. 11:** Aussehen der Nährböden und Morphologie von typischen und untypischen Salmonellenkolonien nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C

| Nährboden | unbeimpft                    | typische Salmonellen   |  |                                | untypische Salmonellen   |  |                                |
|-----------|------------------------------|--|--|--------------------------------|--|--|--------------------------------|
|           |                              | Nährboden  | Koloniemorphologie                                     | Koloniegröße + Wachstumsstärke | Nährboden  | Koloniemorphologie   | Koloniegröße + Wachstumsstärke |
| BPLS      | rotbraun;<br>klar            | tiefrot;<br>klar   | nb-durchscheinend                                      | ca. 2-3 mm;<br>stark           | m.o.w. orangerot, gelb-orange oder gelblichgrün;<br>klar   | nb-durchscheinend  | ca. 2-3 mm,<br>stark           |
| DCLS      | rosa-orangerot;<br>klar      | hellgelb;<br>klar  | nb-durchscheinend,<br>z.T. m.o.w. schwarz <sup>1</sup> | ca. 1 mm;<br>schwach           | 1.) uv rosaorangerot, klar   | nb-durchscheinend  | max. 1 mm;<br>sehr schwach     |
|           |                              |  |  |                                | 2.) uv, evtl. um Kolonien ganz leicht aufgehellt   | pinkfarben, dunkel, deckend, z.T. schwarzes Zentrum oder ganz schwarz  | ca. 2mm;<br>stark              |
| HE        | blau;<br>klar                | uv blau;<br>klar   | nb, z.T. m.o.w. schwarz <sup>1</sup>                   | ca. 2-3 mm;<br>stark           | blaugrün, klar; um Kolonien z.T. trübröt oder gelblich; trüb   | dunkel, grünlich, meist mit hellem oder orangefarbenem Rand; auch orange-gelb oder schwarz   | ca. 2-3 mm;<br>stark           |
| MLCB      | lila;<br>klar                | um Impfstrich und jede Einzelkolonie deutlich aufgeklärt und farblos, daneben uv lila;<br>klar | dunkel bis schwarz, deckend                            | ca. 3 mm;<br>stark             | uv lila, klar; gelegentlich bei dunklen Kolonien um Impfstrich, selten um Einzelkolonien Aufklärung ähnlich wie bei typischen Salmonellen, aber nie so deutlich aufgeklärt | hell, lila-nb, z.T. mit schwarzem Zentrum oder auch ganz schwarz   | ca. 3 mm;<br>stark             |
| ÖNÖZ      | braungrün<br>dunkel;<br>klar | hell grüngelb;<br>klar   | nb-durchscheinend,<br>z.T. m.o.w. schwarz <sup>1</sup> | ca. 2 mm;<br>stark             | uv oder dunkler, bläulich, grünlich oder rötlich; gelegentlich direkt um Impfstrich leicht gelblich aufgehellt, sonst uv klar  | dunkel: bläulich, grünlich, rötlich oder schmutzig rosa, stets deckend, z.T. heller Rand oder dunkles / schwarzes Zentrum; gelegentlich nb-durchscheinend z.T. mit schwarzem Zentrum | ca. 2 mm;<br>stark             |

*Fortsetzung Tab. 11: Aussehen der Nährböden und Morphologie von typischen und untypischen Salmonellenkolonien nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C*

| Nährboden | unbeimpft       | typische Salmonellen  |   |                                   | untypische Salmonellen   |  |                                   |
|-----------|-----------------|---|---|-----------------------------------|--|--|-----------------------------------|
|           |                 | Nährboden   | Koloniemorphologie  | Koloniegröße + Wachstumsstärke    | Nährboden  | Koloniemorphologie   | Koloniegröße + Wachstumsstärke    |
| RAM-BACH  | rosa; opak      | uv rosa, evtl. etwas stärker rosa; opak   | leuchtend rot bis rosarot, deckend  | ca. 2 mm; stark                   | 1.) uv rosa; opak  | dunkelblau oder -lila  | ca. 2 mm; stark                   |
|           |                 |   |   |                                   | 2.) etwas heller; opak   | blassrosa-beige, farblos   | ca. 2 mm; stark                   |
| SS        | rosarot; klar   | hell gelblich; klar   | nb-durchscheinend, z.T. m.o.w. schwarz <sup>1</sup>   | ca. 1 mm; schwach                 | uv rosarot, z.T. um Bakterienrasen leicht gelblich oder stärker rosafarben; klar   | schmutzig rosafarben, dunkel oder schwarz, z.T. mit hellem Rand; nb mit schwarzem Zentrum; stets deckend     | schwach                           |
| WS        | beige; opak     | dunkel, z.T. schwarz-braun, von der Rückseite betrachtet unter Kolonien ganz dunkel, Verfärbung nicht wegwischt; opak | Einzelkolonien glänzend grau-grün, dunkel, Bakterienrasen schwarz oder silbern, metallisch glänzend | ca. 3 mm, z.T. auch größer; stark | 1.) sehr hell: beige, grünlich, türkis   | nb, meist hell: beige, grünlich, türkis  | ca. 1 mm; schwach                 |
|           |                 |   |   |                                   | 2.) dunkel nur unter dunklen Kolonien, Verdunkelung von der Rückseite her kaum sichtbar und mit der Kolonie wegweischt   | selten bräunlich oder dunkel(grün)   | ca. 3 mm, z.T. auch größer; stark |
| XLD       | orangerot; klar | tiefrot; klar   | schwarz oder nb, deckend, z.T. mit hellem Rand  | ca. 2-3 mm; stark                 | um Kolonien/Impfstrich gelb-orange, trüb; weiter entfernt uv; gelegentlich bei schwarzen Kolonien um dichten Rasen tiefrot ähnlich wie bei typischen Salmonellen; sonst uv; nach 48 Stunden Rotfärbung verstärkt | weißgelb, deckend, z.T. schwarzes Zentrum; schwarz mit hellem Rand; Schwarzfärbung nach 48 Stunden verstärkt | ca. 2-3 mm; stark                 |

**Abkürzungen:** m.o.w.: mehr oder weniger; nb: Nährbodenfarben; uv: unverändert; <sup>1</sup>: Nährbodenfarben mit schwarzem Zentrum oder schwarz mit hellem Rand, selten sogar ganz schwarz



Die Wachstumsstärke auf diesen beiden Nährböden ist nach 48 Stunden immer noch als schwach zu bezeichnen.

Auch auf dem WS-Agar, für den der Hersteller eine evtl. auf bis zu 48 Stunden verlängerte Bebrütungsdauer vorschlägt, traten nach dieser Zeit keine bedeutenden Veränderungen der Koloniemorphologie und Wachstumsstärke gegenüber der 24-stündigen Bebrütung auf.

#### **4.2.1.3 Koloniemorphologie und Aussehen der Nährböden bei Salmonellen mit „untypischer“ Koloniemorphologie**

Das Aussehen der neun verschiedenen Nährböden nach Beimpfung mit untypischen Salmonellen und Koloniemorphologie, Koloniegröße und Wachstumsstärke von untypischen Salmonellen nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C ist ebenfalls in Tabelle 11 dargestellt. Hier war besonders auffällig, dass sich auf dem RAMBACH-Agar zwei verschiedene Kolonietypen entwickelten: Salmonellen aus Subspezies IIIa und b wuchsen als dunkelblaue bis -lila-farbene Kolonien, während Subspezies IV-Salmonellen farblose Kolonien bildete.

Nach 48 Stunden Bebrütung waren keine wesentlichen Veränderungen festzustellen.

#### **4.2.2 Morphologie der 86 getesteten Salmonellenstämme auf den eingesetzten Nährböden**

Unter den neun getesteten Nährböden findet sich keiner, auf dem alle 86 Salmonellenstämme typische und somit verdächtige Kolonien entwickelt haben. Anzahl und prozentualer Anteil der auf den untersuchten Nährböden in typischer Form gewachsenen Stämme sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

##### **4.2.2.1 Anteil typisch gewachsener Salmonellenstämme auf dem jeweiligen Nährboden**

Auf dem MLCB-Agar wuchsen insgesamt 78 der 86 untersuchten Salmonellenstämmen in einer für Salmonellen typischen Morphologie und führten eine ebenfalls für Salmonellen typische Nährbodenveränderung herbei; diese Stämme würden bei einer Routineuntersuchung als



**Tab. 12:** Anzahl und prozentualer Anteil der typisch gewachsenen Salmonellenstämme auf den neun getesteten Nährböden

| Subspezies<br>(Gesamt-<br>anzahl) | Anzahl (n) und relativer Anteil der typisch gewachsenen Salmonellenstämme |     |      |     |    |     |      |     |      |     |      |    |    |     |    |     |     |     |
|-----------------------------------|---|-----|------|-----|----|-----|------|-----|------|-----|------|----|----|-----|----|-----|-----|-----|
|                                   | BPLS  |     | DCLS |     | HE |     | MLCB |     | ÖNÖZ |     | RAMB |    | SS |     | WS |     | XLD |     |
|                                   | n   | %   | n    | %   | n  | %   | n    | %   | n    | %   | n    | %  | n  | %   | n  | %   | n   | %   |
| I (24)                            | 23  | 96  | 23   | 96  | 23 | 96  | 23   | 96  | 23   | 96  | 23   | 96 | 23 | 96  | 23 | 96  | 23  | 96  |
| II (15)                           | 15  | 100 | 15   | 100 | 15 | 100 | 14   | 93  | 15   | 100 | 13   | 87 | 15 | 100 | 15 | 100 | 15  | 100 |
| IIIa (10)                         | 10  | 100 | 10   | 100 | 10 | 100 | 9    | 90  | 10   | 100 | 1    | 10 | 10 | 100 | 9  | 90  | 9   | 90  |
| IIIb (19)                         | 8   | 42  | 8    | 42  | 9  | 47  | 15   | 79  | 6    | 32  | 0    | 0  | 8  | 42  | 13 | 68  | 6   | 32  |
| IV (17)                           | 17  | 100 | 15   | 88  | 17 | 100 | 16   | 94  | 17   | 100 | 0    | 0  | 17 | 100 | 11 | 65  | 17  | 100 |
| s. r. (1)                         | 1   | 100 | 1    | 100 | 1  | 100 | 1    | 100 | 1    | 100 | 0    | 0  | 1  | 100 | 0  | 0   | 1   | 100 |
| gesamt (86)                       | 74  | 86  | 72   | 84  | 75 | 87  | 78   | 91  | 72   | 84  | 37   | 43 | 74 | 86  | 71 | 83  | 71  | 83  |

**Abkürzungen:** RAMB: RAMBACH-Agar; s.r.: serologisch rau

Salmonellen auffallen. Dies entspricht einem Anteil von 91 %; damit nimmt der MLCB-Agar die Spitzenposition unter den getesteten Nährböden ein. Auf dem HE-Agar wuchsen 75 Salmonellenstämme in salmonellentypischer Form und würden als solche erkannt; das entspricht einer Identifizierungsrate von 87 %.

Dicht darauf folgen der BPLS- und der SS-Agar mit jeweils 74 typisch gewachsenen Stämmen, das entspricht 86 %. Auf diesen beiden Nährböden wuchsen mit zwei Ausnahmen stets die gleichen Salmonellenstämme in typischer Form. Stamm ZFF 1830/99, ein Serovar aus der Subspezies IIIb aus einem Chamäleon, bildete auf dem BPLS-Agar typische und auf dem SS-Agar untypische Kolonien. Mit Stamm ZFF 1490/99, ebenfalls einem Vertreter der Subspezies IIIb aus einem Tigerpython, *Python morulus*, war es genau umgekehrt.

Mit dem DCLS- und dem ÖNÖZ-Agar würden jeweils noch 72 (84 %), mit dem WS- und dem XLD jeweils 71 (83 %) Stämme erkannt.

Auf dem RAMBACH-Agar bildeten nur 37 von 86 (43 %) Salmonellenstämmen typische Kolonien. Das bedeutet, dass nicht einmal die Hälfte aller Stämme bei Verwendung dieses Nährbodens einen Salmonellenverdacht ergeben würde.

#### 4.2.2.2 Typische Morphologie bei den verschiedenen Salmonellen-Subspezies

Während auf den meisten Nährböden alle oder zumindest fast alle Vertreter der Subspezies I, II, IIIa und IV typische Wuchsformen und Nährbodenfärbungen zeigen, bereitet die Identifi-



kation von Salmonellen aus Subspezies IIIb große Schwierigkeiten. Auf keinem Nährboden wuchsen alle 19 untersuchten Serovare aus dieser Subspezies in salmonellentypischer Form (Tab. 12 und Abb. 20).

Wiederum weist der MLCB-Agar die höchste Entdeckungsrate mit 79 % bei den Subspezies IIIb-Salmonellen auf.

An zweiter Stelle steht hier der WS-Agar mit 68 % typischen Salmonellenstämmen.

Mit allen anderen Nährböden würde man nicht einmal 50 % der Subspezies IIIb-Salmonellen entdecken.

Besondere Erwähnung verdient nochmals der RAMBACH-Agar, auf dem nur einer von zehn Subspezies IIIa-Stämmen und kein einziger der 19 Subspezies IIIb-Stämme und der 17 Subspezies IV-Stämme erkannt würden. Salmonellen aus Subspezies IV bildeten auf diesem Nährboden durchweg farblose Kolonien. Vertreter aus der Subspezies IIIa und IIIb wuchsen zumeist als dunkelblaue bis lilafarbene oder blau (-grüne) Kolonien.

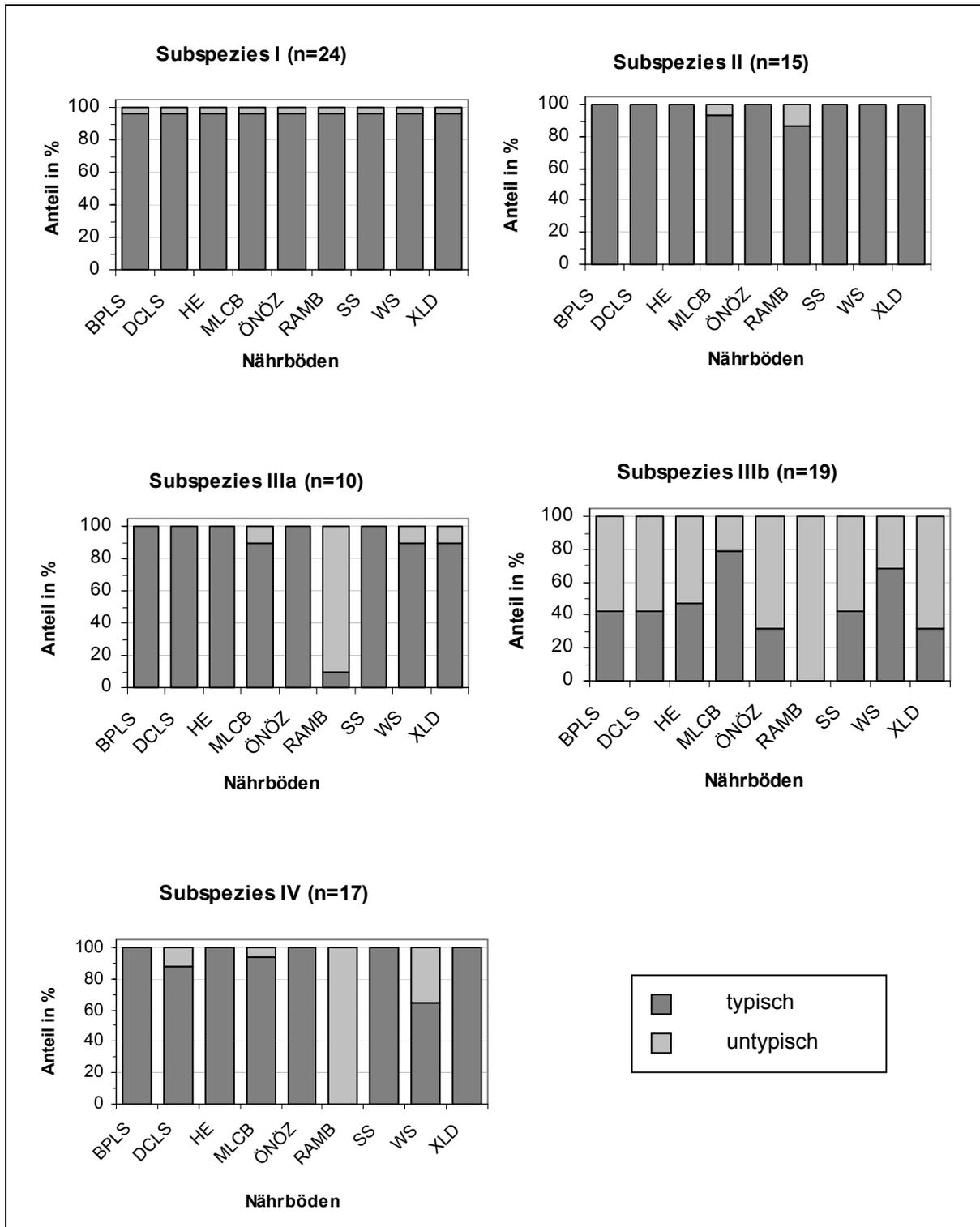
Außerdem konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass auf diesem Nährboden die Koloniezahl der Salmonellen bei gleichem Ausgangsmaterial und gleicher Inokulumgröße im Vergleich zum N1-Agar regelmäßig um ca. 50 % reduziert war.

Der WS-Agar identifizierte nur 65 % der Stämme aus Subspezies IV und steht damit in der Eignung für die Isolation von Salmonellen aus dieser Subspezies vor dem RAMBACH-Agar an vorletzter Stelle.

In der Subspezies I befindet sich ein Salmonellenstamm, der im Gegensatz zu allen anderen Vertretern aus dieser Subspezies, die auf allen Nährböden typische Kolonien bildeten, auf allen getesteten Nährböden in untypischer Form wuchs. Dies war der Salmonellenstamm ZFF 42/99, *S. Aprad* mit der Antigenformel 45:z<sub>10</sub>:- aus einer Kaiserboa, *Boa constrictor*.

Der serologisch raue und somit serologisch nicht zu bestimmende Salmonellenstamm ZFF 137/99 aus einem Grünen Leguan, *Iguana iguana*, bildete auf dem RAMBACH-Agar farblose Kolonien wie Subspezies IV-Salmonellen.

Im Tabellenanhang sind die 86 untersuchten Salmonellenstämmen mit ihrer typischen bzw. untypischen Koloniemorphologie auf den verschiedenen Nährböden nach Subspezies geordnet aufgelistet.



**Abb. 20:** Verhältnis der auf den neun verschiedenen Nährböden typisch gewachsenen zu den untypisch gewachsenen Salmonellenstämmen, nach Subspezies aufgeteilt

**Abkürzungen:** n: Anzahl der getesteten Serovare der jeweiligen Subspezies; RAMB: RAMBACH-Agar



## **4.3 ÜBERPRÜFUNG DER ANZUCHTBEDINGUNGEN MITTELS KOTUNTERSUCHUNGEN**

### **4.3.1 Untersuchte Kotproben**

Es wurden 172 Kotproben untersucht. 167 Proben stammten von Schildkröten, die einmalig beprobt wurden, drei waren von drei Schildkröten, die nach ca. drei Wochen nachuntersucht wurden. Zwei kamen von zwei Echsen, die mit Schildkröten vergesellschaftet waren und daher mituntersucht wurden.

Von diesen 172 Proben waren 22 salmonellenpositiv. 18 davon stammten aus der Schildkröten-Erstuntersuchung, zwei aus der Nachuntersuchung von zwei Schildkröten, und zwei von den untersuchten Echsen.

Alle 172 Proben wurden in RV angereichert, 113 wurden zusätzlich auch in S angereichert. Nach 24 und 48 Stunden wurde aus beiden Anreicherungsbouillons auf verschiedene Nährböden ausgestrichen. Zusätzlich wurde jede Probe direkt auf verschiedene Nährböden ausgestrichen.

### **4.3.2 Identifizierung der positiven Proben**

Acht der 22 salmonellenpositiven Proben wurden bereits im Direktausstrich wegen typischer Koloniemorphologie erkannt. Elf Salmonellenisolate wurden nach 24-stündiger Anreicherung in RV gefunden. Nach 48-stündiger Anreicherung in RV wurden zwei weitere positive Proben identifiziert. Die Anreicherung in S brachte nach 24 Stunden eine zusätzliche positive Probe, nach 48 Stunden aber kein weiteres positives Ergebnis. In Tabelle 13 sind die 22 positiven Proben und die Nährmedien, aus denen die Salmonellen nach Ausstreichen bzw. Anreicherung isoliert wurden, dargestellt.

**Tab. 13:** Zeitpunkt der Identifizierung der insgesamt 22 salmonellenpositiven Proben

| Identifizierung nach |           |           |           |           |            |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Direkt-<br>ausstrich | BPLS      |           |           | 3 (14 %)  | 8 (36 %)   |
|                      | DCLS      |           |           | 2 (9 %)   |            |
|                      | XLD       |           |           | 3 (14 %)  |            |
|                      | insgesamt |           |           |           |            |
| Anrei-<br>cherung    | RV        | 24 h      | BPLS      | 10 (45 %) | 14 (64 %)  |
|                      |           |           | XLD       | 1 (5 %)   |            |
|                      |           | insgesamt | 11 (50 %) |           |            |
|                      | 48 h      | BPLS      | 2 (9 %)   |           |            |
|                      |           | insgesamt | 13 (59 %) |           |            |
|                      | S         | 24 h      | XLD       | 1 (5 %)   |            |
|                      | insgesamt |           |           |           |            |
| insgesamt            |           |           |           |           | 22 (100 %) |

*Abkürzungen: h: Stunden*

### 4.3.3 Untersuchung der Nährböden nach Bebrütung

#### 4.3.3.1 Positive Proben

Bei der Auswertung der Nährbodenplatten wurde nicht von jedem gramnegativen, oxidase-negativen Stäbchen ein API angelegt. Bei mehreren solcher Kulturen auf verschiedenen Platten, die mit ein und derselben Probe beimpft worden waren, wurde ein Nährboden ausgewählt, von dem der API angelegt wurde. Nach Möglichkeit war dies der BPLS-Agar; sonst entschieden Kriterien wie z.B. Reinheit oder Wachstumsstärke, von welchem Nährboden der API angelegt wurde. Falls bei der Auswertung des API Salmonellen identifiziert wurden, ging man davon aus, dass dieses Ergebnis auch bei Kolonien mit gleicher Morphologie auf dem gleichen Agar bzw. entsprechender Morphologie auf anderen Nährböden herausgekommen wäre. Deshalb wurde von diesen Kolonien kein weiterer API angelegt. Wurden bei der Auswertung des API keine Salmonellen identifiziert, wurde entweder von einer Platte aus einem nachfolgenden Anreicherungsschritt in RV oder S von einer entsprechenden Kultur ein API angelegt, oder er wurde von den vorher „ausgemusterten“ Platten wiederholt. Alle Platten wurden deshalb immer bis zum Ende der Analyse einer Probe aufbewahrt.

Aus diesem Grund kann bei der folgenden Bewertung der Anreicherungsmedien und Nährböden nicht von tatsächlich positiven oder negativen Proben gesprochen werden, sondern



nur von verdächtigen, also in salmonellentypischer Morphologie und mit entsprechender Nährbodenfärbung wachsenden, und von unverdächtigen und evtl. noch von fraglichen Proben.

In den Tabellen 14-16 ist die Auswertung der mit den 22 positiven Proben beimpften Nährböden im Direktausstrich und nach Anreicherung in RV und in S dargestellt.

### Direktausstrich

Aus Tabelle 14 ist zu ersehen, dass im Direktausstrich die meisten der 22 positiven Proben auf BPLS verdächtig erschienen. Von 22 positiven Proben wurden 21 auf diesem Nährboden angezüchtet. Zehn davon ergaben verdächtige Kolonien, das entspricht einem Anteil von 48 %. Die geringste Anzahl verdächtiger Proben erschien mit fünf von 22 auf dem WS-Agar, was einen Anteil von nur 23 % ausmacht. Die Ergebnisse der anderen drei im Direktausstrich verwendeten Nährböden HE, DCLS und XLD rangieren dazwischen.

Andererseits jedoch erschienen auf dem WS-Agar im Direktausstrich die wenigsten der positiven Proben unverdächtig. Nur drei der 22 positiven, auf WS-Agar ausgestrichenen Proben bildeten unverdächtige Kolonien, die bei der Routineuntersuchung übersehen würden. Der BPLS-Agar liegt mit 33 % unverdächtigen Platten an zweiter Stelle. Am meisten unverdächtige Kolonien wuchsen mit 57 bzw. 56 % auf HE bzw. XLD.

**Tab. 14: Direktausstrich der 22 salmonellenpositiven Proben, Auswertung der Nährböden**

| Proben            |    | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |           |              |
|-------------------|----|--|-----------|--------------|
| ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich  | unverdächtig |
| BPLS              | 21 | 10 (48 %)                                  | 4 (19 %)  | 7 (33 %)     |
| DCLS              | 15 | 5 (33 %)                                   | 4 (27 %)  | 6 (40 %)     |
| HE                | 7  | 3 (43 %)                                   | 0 (0 %)   | 4 (57 %)     |
| WS                | 22 | 5 (23 %)                                   | 14 (64 %) | 3 (14 %)     |
| XLD               | 16 | 6 (38 %)                                   | 1 (6 %)   | 9 (56 %)     |

**Abkürzungen:** n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben

### Anreicherung in RV

Auch nach 24- und 48-stündiger Anreicherung in RV finden sich die meisten verdächtigen Proben auf dem BPLS-Agar (Tab. 15). 95 % Platten mit verdächtigen Kolonien nach 24 und 100 % nach 48 Stunden sind das beste Ergebnis überhaupt, das in dieser Studie erreicht wurde. Gleich danach kommt der XLD-Agar mit 94 % verdächtigen Proben zu beiden Aus-



strichzeiten. Auf HE wuchsen zu beiden Zeitpunkten nur 71 % verdächtige Kolonien, was das niedrigste Ergebnis nach 24-stündiger Bebrütung in RV darstellt. Nach 48 Stunden Bebrütung sank jedoch der Anteil der verdächtigen Proben auf WS von 82 % nach 24 Stunden auf nur noch 55 %, die niedrigste Rate nach 48 Stunden. Beim DCLS-Agar dagegen stieg in dieser Zeit der Anteil der Platten mit verdächtigen Kolonien von 80 auf 93 % an.

Die meisten unverdächtigen Proben bildeten sich nach 24-stündiger Bebrütung des RV-Mediums auf dem HE-Agar mit 29 %. Auf BPLS, XLD und DCLS erschienen mit 5, 6 und 7 % gleichmäßig wenig unverdächtige Proben. Der WS-Agar liegt hier mit 14 % unverdächtigen Platten in der Mitte.

Insgesamt stieg der Anteil der verdächtigen Platten nach Anreicherung in RV gegenüber dem Direktausstrich auf allen Nährböden erheblich an, während der Anteil der unverdächtig erscheinenden Platten, vor allem nach 48-stündiger Bebrütung, deutlich abnahm. Auch die Anzahl der fraglichen Platten sank bei Anreicherung in RV im Vergleich zum Direktausstrich.

**Tab. 15:** Anreicherung von 22 salmonellenpositiven Proben in RV, Auswertung der Nährböden

| Proben                      |    | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |          |              |
|-----------------------------|----|--|----------|--------------|
| nach 24 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |
| BPLS                        | 21 | 20 ( 95 %)                                 | 0 ( 0 %) | 1 ( 5 %)     |
| DCLS                        | 15 | 12 ( 80 %)                                 | 2 (13 %) | 1 ( 7 %)     |
| HE                          | 7  | 5 ( 71 %)                                  | 0 ( 0 %) | 2 (29 %)     |
| WS                          | 22 | 18 ( 82 %)                                 | 1 ( 5 %) | 3 (14 %)     |
| XLD                         | 16 | 15 ( 94 %)                                 | 0 ( 0 %) | 1 ( 6 %)     |
| nach 48 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |
| BPLS                        | 21 | 21 (100 %)                                 | 0 ( 0 %) | 0 ( 0 %)     |
| DCLS                        | 15 | 14 ( 93 %)                                 | 1 ( 7 %) | 0 ( 0 %)     |
| HE                          | 7  | 5 ( 71 %)                                  | 0 ( 0 %) | 2 (29 %)     |
| WS                          | 22 | 12 ( 55 %)                                 | 8 (36 %) | 2 ( 9 %)     |
| XLD                         | 16 | 15 ( 94 %)                                 | 1 ( 6 %) | 0 ( 0 %)     |

**Abkürzungen:** h: Stunden; n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben

### Anreicherung in S

Nach Anreicherung in S erschienen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden mit 69 % die meisten Proben auf XLD verdächtig (Tab. 16). An zweiter Stelle liegt der DCLS-Agar mit 58 bzw. 63 % verdächtige Proben nach 24 bzw. 48 Stunden. Mit nur 37 % verdächtigen Proben nach 24 Stunden Bebrütung ist dies das schlechteste Ergebnis für den BPLS-Agar überhaupt. Der Anteil der Platten mit unverdächtigen Kolonien liegt nach Anreicherung in S



zu beiden Ausstrichzeiten bei allen Nährböden zwischen 20 und 50 %; nur auf HE erschien nach Selenitanreicherung keine einzige unverdächtige Probe, ein Ergebnis, das dieser Nährboden nach Anreicherung in RV nie erreicht hatte.

Auf keiner einzigen Platte, weder im Direktausstrich noch nach Anreicherung in RV oder S, konnte bei den salmonellenpositiven Proben kein Bakterienwachstum beobachtet werden. Auf jeder Platte entwickelten sich Kolonien.

**Tab. 16:** Anreicherung von 19 salmonellenpositiven Proben in S, Auswertung der Nährböden

| Anzahl der Proben           |    | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |          |              |
|-----------------------------|----|--|----------|--------------|
| nach 24 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |
| BPLS                        | 19 | 7 (37 %)                                   | 7 (37 %) | 5 (26 %)     |
| DCLS                        | 19 | 11 (58 %)                                  | 4 (21 %) | 4 (21 %)     |
| HE                          | 6  | 3 (50 %)                                   | 0 ( 0 %) | 3 (50 %)     |
| XLD                         | 13 | 9 (69 %)                                   | 1 ( 8 %) | 3 (23 %)     |
| nach 48 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |
| BPLS                        | 19 | 11 (58 %)                                  | 1 ( 5 %) | 7 (37 %)     |
| DCLS                        | 19 | 12 (63 %)                                  | 0 ( 0 %) | 7 (37 %)     |
| HE                          | 6  | 3 (50 %)                                   | 3 (50 %) | 0 ( 0 %)     |
| XLD                         | 13 | 9 (69 %)                                   | 0 ( 0 %) | 6 (46 %)     |

**Abkürzungen:** h: Stunden; n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben

#### 4.3.3.2 Negative Proben

Die 150 negativen Kotproben wurden auf verschiedene Nährböden direkt ausgestrichen und in RV bei 41 °C angereichert. Aus dieser Anreicherung wurde nach jeweils 24 und 48 Stunden auf verschiedene Nährböden ausgestrichen. 94 negative Kotproben wurden zusätzlich in S angereichert und ebenfalls nach 24- und 48-stündiger Bebrütung auf verschiedene Nährböden ausgestrichen.

#### Direktausstrich

Im Direktausstrich wuchsen von den auf BPLS-Agar ausgestrichenen salmonellennegativen Proben 14 % in salmonellenverdächtigster Form. Dies ist die höchste Rate an falsch-positiven Ergebnissen aller im Direktausstrich getesteten Nährböden. Auf dem ÖNÖZ-Agar erschienen 10 % der Proben verdächtig; DCLS, WS und HE lagen zwischen zwei und sechs Prozent. Der XLD-Agar zeigte keine verdächtigen Kolonien.



Die meisten unverdächtigen Proben ergaben sich auf ÖNÖZ und DCLS mit 90 bzw. 86 %. Hier liegt der BPLS-Agar mit nur 51 % unverdächtigen Proben ganz am Ende der Rangfolge. WS, HE und XLD nehmen eine Mittelstellung ein.

Totale Wachstumshemmung der Begleitflora konnte nur auf sehr wenigen Nährbodenplatten beobachtet werden. Den größten Anteil in dieser Hinsicht hat der WS-Agar mit 39 % und der DCLS-Agar mit 17 % nicht bewachsenen Platten.

In Tabelle 17 ist die Auswertung der 150 Proben im Direktausstrich auf den verschiedenen eingesetzten Nährböden dargestellt.

**Tab. 17: Direktausstrich der 150 salmonellennegativen Proben, Auswertung der Nährböden**

| Proben            |     | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |           |              |                 |
|-------------------|-----|--|-----------|--------------|-----------------|
| ausgestrichen auf | n   | verdächtig                                 | fraglich  | unverdächtig |                 |
|                   |     |  |           | gesamt       | nicht gewachsen |
| BPLS              | 149 | 20 (14 %)                                  | 52 (35 %) | 76 (51 %)    | 5 (3 %)         |
| DCLS              | 87  | 2 (2 %)                                    | 10 (11 %) | 75 (86 %)    | 15 (17 %)       |
| HE                | 79  | 5 (6 %)                                    | 15 (19 %) | 59 (75 %)    | 1 (1 %)         |
| ÖNÖZ              | 31  | 3 (10 %)                                   | 0 (0 %)   | 28 (90 %)    | 0 (0 %)         |
| WS                | 61  | 3 (5 %)                                    | 17 (28 %) | 41 (67 %)    | 24 (39 %)       |
| XLD               | 49  | 0 (0 %)                                    | 11 (22 %) | 38 (78 %)    | 1 (2 %)         |

**Abkürzungen:** n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben

### Anreicherung in RV

Nach 24-stündiger Bebrütung der salmonellennegativen Proben in RV bei 41 °C erschienen bei allen untersuchten Nährböden erheblich weniger Platten mit verdächtigen Kolonien als im Direktausstrich. Auf WS, XLD und ÖNÖZ wuchsen nach dieser Selektivanreicherung überhaupt keine verdächtigen Kolonien mehr. Auf HE, BPLS und DCLS traten noch zwei bis vier Prozent verdächtige Proben auf (Tab. 18).

Der Anteil der Platten mit unverdächtigen Kolonien dagegen ist nach dieser Selektivanreicherung massiv gestiegen und liegt bei allen Nährböden über 90 %. Der HE-Agar zeigt hier mit 91 % das schlechteste Ergebnis, WS und XLD erreichen sogar 100 %.

Auch der Anteil der nicht bewachsenen Platten hat nach der Anreicherung deutlich zugenommen. Genau wie im Direktausstrich nimmt der WS-Agar hier wiederum die Spitzenposition ein mit 95 % nicht bewachsener Platten. Totale Wachstumshemmung der Begleitflora wurde auf HE und ÖNÖZ mit 34 bzw. 28 % am seltensten beobachtet.



Nach weiteren 24 Stunden Bebrütung der negativen Kotproben in RV-Bouillon bei 41 °C traten auf keinem Nährboden entscheidende Veränderungen auf. Der Vergleich der beim zweiten Ausstrich erhaltenen Platten mit den ersten ergibt nur leichte Verschiebungen. Insgesamt bleibt der Anteil der verdächtigen Platten niedrig, der der unverdächtigen hoch.

**Tab. 18:** Anreicherung von 150 salmonellennegativen Proben in RV, Auswertung der Nährböden

| Proben                      |     | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |          |              |                 |
|-----------------------------|-----|--|----------|--------------|-----------------|
| nach 24 h ausgestrichen auf | n   | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |                 |
|                             |     |  |          | gesamt       | nicht gewachsen |
| BPLS                        | 149 | 5 (3 %)                                    | 1 (1 %)  | 142 ( 96 %)  | 83 (56 %)       |
| DCLS                        | 57  | 2 (4 %)                                    | 1 (2 %)  | 54 ( 95 %)   | 50 (88 %)       |
| HE                          | 98  | 2 (2 %)                                    | 7 (7 %)  | 89 ( 91 %)   | 33 (34 %)       |
| ÖNÖZ                        | 31  | 0 (0 %)                                    | 2 (6 %)  | 29 ( 94 %)   | 21 (28 %)       |
| WS                          | 22  | 0 (0 %)                                    | 0 (0 %)  | 22 (100 %)   | 21 (95 %)       |
| XLD                         | 27  | 0 (0 %)                                    | 0 (0 %)  | 27 (100 %)   | 20 (74 %)       |
| nach 48 h ausgestrichen auf | n   | verdächtig                                 | fraglich | unverdächtig |                 |
|                             |     |  |          | gesamt       | nicht gewachsen |
| BPLS                        | 149 | 5 (3 %)                                    | 3 (2 %)  | 140 (95 %)   | 81 (55 %)       |
| DCLS                        | 57  | 1 (2 %)                                    | 1 (2 %)  | 55 (96 %)    | 40 (70 %)       |
| HE                          | 123 | 0 (0 %)                                    | 4 (3 %)  | 119 (97 %)   | 61 (50 %)       |
| WS                          | 22  | 0 (0 %)                                    | 0 (0 %)  | 22 (100 %)   | 20 (91 %)       |
| XLD                         | 27  | 1 (4 %)                                    | 2 (7 %)  | 24 (89 %)    | 18 (67 %)       |

**Abkürzungen:** h: Stunden; n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben

### Anreicherung in S

Die Anreicherung der salmonellennegativen Proben in S bei 37 °C (Tab. 19) bringt insgesamt ähnliche Ergebnisse wie der Direktausstrich. Aus S wurde nicht auf WS ausgestrichen, da diese beiden Nährmedien nicht miteinander kombinierbar sind. Salmonellen werden sehr stark gehemmt, da diese Kombination toxisch für sie ist (HARVEY & PRICE, 1968 und 1979).

Nach 24 Stunden Bebrütung liegt der Anteil der verdächtigen Proben bei allen Nährböden in etwa bei zehn Prozent, der ÖNÖZ-Agar erreicht sogar eine Spitze von 19 %. Somit ist der Anteil der verdächtigen Proben nach 24-stündiger Anreicherung in S im Vergleich zum Direktausstrich bei allen Nährböden mit Ausnahme des BPLS-Agars deutlich gestiegen. Auf diesem Nährboden hat sich die Zahl der verdächtig erscheinenden Proben nach der Anreicherung halbiert.



Der Anteil der unverdächtig erscheinenden Proben liegt nach 24 Stunden Anreicherung in S bei allen Nährböden zwischen 72 und 85 %. Das ergibt eine Zunahme um 20 % beim BPLS- und eine Abnahme um 13 % beim ÖNÖZ-Agar; damit büßt der ÖNÖZ-Agar seine Spitzenposition in Bezug auf unverdächtige Proben im Direktausstrich ein. Bei den übrigen Nährböden sind keine großen Unterschiede in der Rate der unverdächtig Proben beim Direktausstrich und nach 24-stündiger Selenitanreicherung auszumachen.

Der Anteil der Platten ohne Bakterienwachstum ist nach 24-stündiger Anreicherung in S im Vergleich zum Direktausstrich bei den meisten verwendeten Nährböden angestiegen, erreicht aber bei weitem nicht die Werte, die bei der Anreicherung in RV beobachtet wurden. Sie liegen nach der Anreicherung in S zwischen 28 % beim HE- und 4 % beim XLD-Agar.

Nach 48-stündiger Anreicherung in S ist der Anteil der verdächtigen Platten bei den salmonellennegativen Proben bei den meisten Nährböden nochmals deutlich gestiegen und liegt über zehn Prozent.

Der Anteil der unverdächtig Proben hat sich hingegen kaum verändert; die totale Wachstumshemmung der Begleitflora ist im Vergleich zu den Ergebnissen nach 24-stündiger Anreicherung gesunken und erreicht etwa das gleiche Niveau wie beim Direktausstrich. Der HE-Agar zeigt mit 13 % die stärkste Hemmung, die wirkungsvolle Hemmung des DCLS-Agars im Direktausstrich ist auf nur noch 2 % gesunken.

**Tab. 19:** Anreicherung von 94 salmonellennegativen Proben in S, Auswertung der Nährböden

| Anzahl der Proben           |    | Kultur erscheint auf verwendetem Nährboden |           |              |                 |
|-----------------------------|----|--|-----------|--------------|-----------------|
| nach 24 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich  | unverdächtig |                 |
|                             |    |  |           | gesamt       | nicht gewachsen |
| BPLS                        | 94 | 7 (7 %)                                    | 19 (20 %) | 68 (72 %)    | 14 (15 %)       |
| DCLS                        | 64 | 6 (9 %)                                    | 9 (14 %)  | 49 (77 %)    | 7 (11 %)        |
| HE                          | 43 | 4 (9 %)                                    | 5 (12 %)  | 34 (79 %)    | 12 (28 %)       |
| ÖNÖZ                        | 31 | 6 (19 %)                                   | 1 (3 %)   | 24 (77 %)    | 3 (10 %)        |
| XLD                         | 26 | 2 (8 %)                                    | 2 (8 %)   | 22 (85 %)    | 1 (4 %)         |
| nach 48 h ausgestrichen auf | n  | verdächtig                                 | fraglich  | unverdächtig |                 |
|                             |    |  |           | gesamt       | nicht gewachsen |
| BPLS                        | 94 | 12 (13 %)                                  | 14 (15 %) | 68 (72 %)    | 4 (4 %)         |
| DCLS                        | 64 | 11 (17 %)                                  | 6 (9 %)   | 47 (73 %)    | 1 (2 %)         |
| HE                          | 68 | 9 (13 %)                                   | 11 (16 %) | 48 (71 %)    | 9 (13 %)        |
| XLD                         | 26 | 2 (8 %)                                    | 2 (8 %)   | 22 (85 %)    | 0 (0 %)         |

**Abkürzungen:** h: Stunden; n: Anzahl der auf dem jeweiligen Nährboden ausgestrichenen Proben



## 4.4 KOTUNTERSUCHUNG

### 4.4.1 Einmalige Kotuntersuchung

#### 4.4.1.1 Salmonellenisolate

Bei 18 von 167 untersuchten Schildkröten konnten bei einmaliger Kotuntersuchung Salmonellen nachgewiesen werden, das entspricht einer Inzidenz von ca. 10 %. Die gefundenen Salmonellenisolate sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

16 der 18 salmonellenpositiven Schildkröten stammten aus dem Bestand der Verkaufstiere (B 9) und privaten Tiere (B 10) der Zoohandlung (Tab. 21). Alle Schildkröten, die gemeinsam in einem Terrarium lebten, sind in Tabelle 21 nach Terrarien geordnet dargestellt.

Die zwei anderen Salmonellenausscheider waren Einzeltiere (Tab. 21).

**Tab. 20:** Salmonellenisolate bei einmaliger Kotuntersuchung von 167 Schildkröten

| Subspezies     | n  | Serovar                                | n  | Tierart        | Herkunft <sup>1</sup> |
|----------------|----|--|----|----------------|-----------------------|
| I              | 10 | S. Potsdam 6,7:l,v:e,n,z <sub>15</sub> | 7  | 1 <i>P. a.</i> | 1 Z                   |
|                |    |  |    | 6 <i>T. g.</i> | 6 W                   |
|                |    | S. Ferruch 8:e,h:1,5                   | 1  | <i>T. g.</i>   | W                     |
|                |    | S. Javiana 9,12:l,z <sub>28</sub> :1,5 | 1  | <i>T. h.</i>   | U                     |
|                |    | S. Hofit 39:i:1,5                      | 1  | <i>P. a.</i>   | W                     |
| II             | 8  | S. Subspezies II 4,12:b:-              | 1  | <i>T. g.</i>   | U                     |
|                |    | S. Subspezies II 40:b:-                | 5  | 3 <i>T. m.</i> | 3 Z                   |
|                |    |  |    | 1 <i>T. h.</i> | Z                     |
|                |    |  |    | 1 <i>P. a.</i> | Z                     |
|                |    | S. Subspezies II 48:d:z <sub>6</sub>   | 2  | 1 <i>T. m.</i> | Z                     |
| 1 <i>A. h.</i> | U  |  |    |                |                       |
| gesamt         | 18 |  | 18 |                | 8 W 3 U 7 Z           |

**Abkürzungen:** n: Anzahl; W: Wildfang; U: unbekannt, sehr wahrscheinlich Wildfang; Z: Nachzucht;  
<sup>1</sup>: Angaben über Herkunft beruhen auf Aussagen der Besitzer; A. h.: *Agrionemys horsfieldii*; P. a.: *Pyxis arachnoides*; T. g.: *Testudo graeca*; T. h.: *Testudo hermanni*; T. m.: *Testudo marginata*



#### 4.4.1.2 Genauere Betrachtung der beiden Bestände der Zoohandlung

Von fünf Breitrandschildkröten in B9/T1 waren drei salmonellenpositiv; sie schieden das gleiche Serovar, *S. Subspez. II 40:b:-*, aus. Bei den beiden anderen Terrarieninsassen konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

Auch bei den Spinnenschildkröten in B10/T3 und den Griechischen Landschildkröten in B9/T3 war nur ein Teil der Terrarienbewohner als Salmonellenträger enttarnt:

Bei den Spinnenschildkröten in B10/T3 waren zwei Tiere Salmonellenausscheider, das dritte war salmonellennegativ. Aus den beiden salmonellenpositiven konnten zwei verschiedene Serovare isoliert werden, *S. Subspez. II 40:b:-* und *S. Potsdam*.

Nur eine der beiden Griechischen Landschildkröten in B9/T3 schied Salmonellen aus; das Serovar war *S. Subspez. II 40:b:-*, das gleiche, das auch bei den drei Breitrandschildkröten in B9/T1 und bei einer der positiven Spinnenschildkröten in B10/T3 gefunden wurde.

Bei einer einzeln in B9/T2 sitzenden Breitrandschildkröte wurde *S. Subspez. II 48:d:z<sub>6</sub>* isoliert. Dieses Serovar tauchte auch bei einer Schildkröte der Art *Agrionemys horsfieldii* in B10/T4 auf.

Drei weitere in B9/T4 zusammenlebenden Breitrandschildkröten waren salmonellennegativ.

Ferner gehörten eine einzeln gehaltene Pantherschildkröte und drei zusammen in einem Terrarium lebende Glattrand-Gelenkschildkröten zum Tierbestand B9, aus ihnen konnten aber keine Salmonellen isoliert werden.

Bei den bisher beschriebenen Schildkröten handelte es sich um ein- bis vierjährige Nachzuchttiere von verschiedenen Züchtern.

Eine noch in Quarantäne in Terrarium T1 sitzende, neu in den Bestand B10 gekommene Spinnenschildkröte schied *S. Hofit* aus.

Bei weiteren fünf Schildkröten dieser Art, die gemeinsam im Terrarium B10/T2 gehalten wurden, konnten keine Salmonellen festgestellt werden.

Dagegen konnte aus allen sechs Maurischen Landschildkröten aus B10/T5, die zwischen 25 und 160 g wogen, *S. Potsdam* isoliert werden; dies ist das gleiche Serovar, das auch bei einer der Spinnenschildkröten in B10/T3 gefunden wurde.

Eine der Maurischen Landschildkröten, die zu zweit in B10/T6 gehalten wurden und ca. 500 g wogen, schied *S. Ferruch* aus.



**Tab. 21:** Zusammenstellung der salmonellenpositiven Einzeltieren (ET) und der beiden Bestände der Zoohandlung mit den Verkaufstieren (B9) und den privaten Tieren (B10), nach Terrarien (T) getrennt

| Bestand | Tier-Nr. | Tierart        | Herkunft <sup>1</sup> | CS-Nr. | Serovar                                       |
|---------|----------|----------------|-----------------------|--------|---|
| -       | ET 1     | <i>T. h.</i>   | U                     | 1      | <i>S. Javiana</i> 9,12:1,z <sub>28</sub> :1,5 |
| -       | ET 2     | <i>T. g.</i>   | U                     | 2      | <i>S. Subspez. II</i> 4,12:b:-                |
| B9/T1   | 1 I      | <i>T. m.</i>   | Z                     | 3      | <i>S. Subspez. II</i> 40:b:-                  |
|         | 4 I      | <i>T. m.</i>   | Z                     | 4      | <i>S. Subspez. II</i> 40:b:-                  |
|         | 5 I      | <i>T. m.</i>   | Z                     | 5      | <i>S. Subspez. II</i> 40:b:-                  |
|         | 2 I      | <i>T. m.</i>   | Z                     | -      | -   |
|         | 3 I      | <i>T. m.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B9/T2   | 25 II    | <i>T. m.</i>   | Z                     | 18     | <i>S. Subspez. II</i> 48:d:z <sub>6</sub>     |
| B9/T3   | 6 I      | <i>T. h.</i>   | Z                     | 6      | <i>S. Subspez. II</i> 40:b:-                  |
|         | 7 I      | <i>T. h.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B9/T4   | 16 II    | <i>T. m.</i>   | Z                     | -      | -   |
|         | 17 II    | <i>T. m.</i>   | Z                     | -      | -   |
|         | 18 II    | <i>T. m.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B9/T5   | 8 I      | <i>G. p.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B9/T6   | 12 I     | <i>K. b.</i>   | Z                     | -      | -   |
|         | 13 I     | <i>K. b.</i>   | Z                     | -      | -   |
|         | 14 I     | <i>K. b.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B10/T1  | 6 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | 9      | <i>S. Hofit</i> 39:i:1,5                      |
| B10/T2  | 1 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | -      | -   |
|         | 2 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | -      | -   |
|         | 3 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | -      | -   |
|         | 4 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | -      | -   |
|         | 5 II     | <i>P. a.</i>   | W                     | -      | -   |
| B10/T3  | 9 I      | <i>P. a.</i> 1 | Z                     | 7      | <i>S. Subspez. II</i> 40:b:-                  |
|         | 11 I     | <i>P. a.</i> 2 | Z                     | 8      | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 10 I     | <i>P. a.</i>   | Z                     | -      | -   |
| B10/T4  | 21 II    | <i>A. h.</i>   | U                     | 17     | <i>S. Subspez. II</i> 48:d:z <sub>6</sub>     |
|         | 19 II    | <i>A. h.</i>   | U                     | -      | -   |
|         | 20 II    | <i>A. h.</i>   | U                     | -      | -   |
|         | 22 II    | <i>A. h.</i>   | U                     | -      | -   |
|         | 23 II    | <i>A. h.</i>   | U                     | -      | -   |
| B10/T5  | 7 II     | <i>T. g.</i>   | W                     | 10     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 8 II     | <i>T. g.</i>   | W                     | 11     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 9 II     | <i>T. g.</i>   | W                     | 12     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 10 II    | <i>T. g.</i>   | W                     | 13     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 11 II    | <i>T. g.</i>   | W                     | 14     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
|         | 11a II   | <i>T. g.</i>   | W                     | 15     | <i>S. Potsdam</i> 6,7:1,v:e,n,z <sub>15</sub> |
| B10/T6  | 12 II    | <i>T. g.</i>   | W                     | 16     | <i>S. Ferruch</i> 8:e,h:1,5                   |
|         | 13 II    | <i>T. g.</i>   | W                     | -      | -   |

**Abkürzungen:** CS-Nr.: Salmonellenstämme, von Christine Schramme isoliert; W: Wildfang; U: unbekannt, sehr wahrscheinlich Wildfang; Z: Nachzucht; <sup>1</sup>: Angaben über Herkunft beruhen auf Aussagen der Besitzer; -: keine Salmonellen isoliert; A. h.: *Agrionemys horsfieldii*; P. a.: *Pyxis arachnoides*; T. g.: *Testudo graeca*; T. h.: *Testudo hermanni*; T. m.: *Testudo marginata*



Schließlich wurden aus einer von fünf zusammenlebenden, ca. 500 g schweren Schildkröten der Art *Agrionemys horsfieldii* aus B10/T4 S. Subspez. II 48:d:z<sub>6</sub> isoliert. Dieses Serovar war auch schon bei der einzeln sitzenden Breitrandschildkröte in B9/T2 nachgewiesen worden. Die übrigen vier Tiere dieses Terrariums waren salmonellennegativ.

Außer den Mittelasiatischen Vierzehen-Steppenschildkröten waren die hier vorgestellten Schildkröten Wildfänge, die zwischen einigen Wochen und zwei Jahren im Besitz waren. Die Herkunft der Tiere der Art *Agrionemys horsfieldii* ist nicht sicher bekannt, wahrscheinlich waren auch sie Wildfänge; drei davon gehörten schon länger in diesem Bestand: Zwei seit etwa vier Jahren und eines schon seit fünf Jahren.

#### **4.4.1.3 Salmonelleninzidenz**

Bestand B9 umfasste insgesamt 15 Nachzuchttiere, von denen fünf, umgerechnet 33 %, salmonellenpositiv waren.

Im Bestand B10 lebten 22 Schildkröten, 14 Wildfänge und drei Nachzuchttiere und fünf, von denen die genaue Herkunft nicht bekannt ist. Elf Tiere schieden zum Untersuchungszeitraum Salmonellen aus. Von den Nachzuchten waren zwei Salmonellenträger; acht gefangene Schildkröten waren salmonellenpositiv, das ist etwa ein Drittel der Wildfänge in B 10.

Die Herkunft der Einzeltiere, aus denen Salmonellen isoliert werden konnten, war ebenfalls unbekannt.

Demnach waren unter insgesamt 53 untersuchten Wildfängen acht Salmonellenausscheider, das ergibt einen Anteil von 15 %.

Unter den 80 untersuchten Nachzuchttieren waren sieben Salmonellenträger, wodurch eine Inzidenz von knapp 9 % erreicht wird.

Von 167 untersuchten Schildkröten waren insgesamt 18, das heißt ca. 10 % salmonellenpositiv.

#### **4.4.2 Wiederholungsuntersuchung**

Von drei Schildkröten konnte ca. drei Wochen nach der ersten Probennahme eine zweite Kotprobe untersucht werden. Diese Tiere waren ET 2, *P. a.* 2 aus B10/T3 und ein bei der ersten



Untersuchung salmonellennegativ getesteter Terrariumsgenosse von *P. a. 2* (Tab. 21). Bei den beiden salmonellenpositiven Schildkröten, ET 2 und *P. a. 2*, wurden nach dieser Zeit erneut Salmonellen nachgewiesen; die Serovare waren die gleichen wie bei der ersten Untersuchung. Bei der Spinnenschildkröte, die mit *P. a. 2* und einer zweiten salmonellenpositiven Schildkröte in B10/T3 vergesellschaftet war, konnten auch bei der zweiten Kotuntersuchung keine Salmonellen festgestellt werden.

#### 4.4.3 Vergesellschaftung von Schildkröten mit Echsen

Die Spinnenschildkröten in B10/T3, bei denen *S. Potsdam* und *S. Subspez. II 40:b:-* gefunden wurden, teilten sich das Terrarium mit drei Madagassischen Kielschildchsen, *Tracheloptychus madagascariensis*. Aus einer Sammelkotprobe dieser Echsen konnte *S. Subspez. IIIa* mit der Antigenformel 59:z<sub>36</sub>:- isoliert werden.

Die Maurischen Landschildkröten in B10/T5 saßen mit einem Hardun, *Agama stellio*, zusammen; in dessen Kotprobe war der Nachweis von *S. Potsdam* möglich, das gleiche Serovar wie bei den Schildkröten, mit denen er vergesellschaftet war.

### 4.5 VERTEILUNG DER SALMONELLEN-SUBSPEZIES AUF DIE VERSCHIEDENEN REPTILIENGRUPPEN

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 86 Salmonellenisolate aus 85 Reptilien der Tiergruppen Schildkröten, Echsen und Schlangen untersucht. Für zwei Isolate aus dem NRL-SALM waren keine Informationen erhältlich, aus welchen Reptilien sie stammten. Aus einem Chamäleon wurden vom ZFF zwei verschiedene Serovare aus unterschiedlichen Organen isoliert.

Die Verteilung dieser 86 Isolate auf die einzelnen Tiergruppen ist in Tabelle 22 und Abbildung 21 dargestellt.

Fast die Hälfte aller untersuchten Salmonellenisolate stammte aus Echsen. Jeweils etwa ein Viertel entfiel auf Schlangen und Schildkröten. Dabei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie über 160 Schildkröten gezielt auf Salmonellen untersucht wurden. Die hierbei ge-



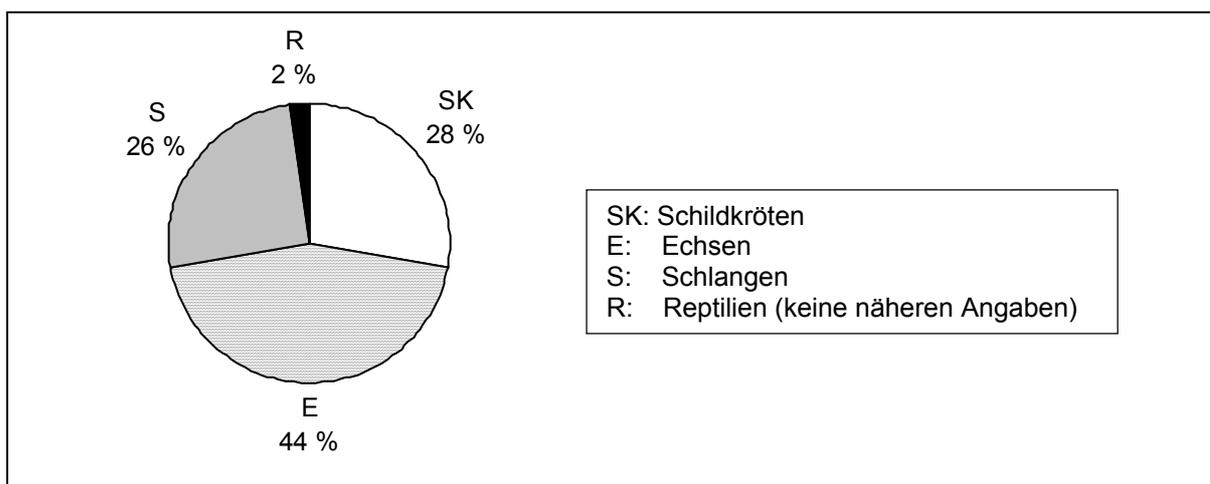
fundenen 18 Salmonellenisolate machen zwei Drittel der insgesamt bei Schildkröten nachgewiesenen Salmonellen aus. Dagegen stellen die aus Echsen und Schlangen isolierten Salmonellen die Situation eines Routine-Diagnostiklabors (ZFF) bzw. eine zufällige Auswahl (NRL-SALM) von Salmonellen aus verschiedenen Reptilien dar, ohne „Begünstigung“ einer bestimmten Tiergruppe.

Trotzdem spiegelt das Diagramm in Abbildung 21 den häufigen Salmonellennachweis bei Echsen wider. Unter Berücksichtigung des oben erwähnten „Schildkrötenüberhangs“ nehmen Schlangen eine Mittelstellung ein, während Schildkröten mit 7 % die niedrigste Salmonellenträgerate aufweisen.

**Tab. 22:** Anzahl und prozentualer Anteil der verschiedenen Subspezies bei den einzelnen Tiergruppen

| Tierart           | Subspezies |    |      |      |    |      | gesamt | Anteil in % |
|-------------------|------------|----|------|------|----|------|--------|-------------|
|                   | I          | II | IIIa | IIIb | IV | s. r |        |             |
| Schildkröten      | 13         | 11 | -    | -    | -  | -    | 24     | 27,9        |
| Echsen            | 7          | 4  | 6    | 8    | 12 | 1    | 38     | 44,2        |
| Schlangen         | 4          | -  | 3    | 11   | 4  | -    | 22     | 25,6        |
| Reptilien, k.w.A. | -          | -  | 1    | -    | 1  | -    | 2      | 2,3         |
| gesamt            | 24         | 15 | 10   | 19   | 17 | 1    | 86     | 100         |

**Abkürzung:** k.w.A.: keine weiteren Angaben; s. r. = serologisch rau



**Abb. 21:** Anteil der einzelnen Tiergruppen an der Gesamtzahl der salmonellenpositiven Tieren (gerundet)

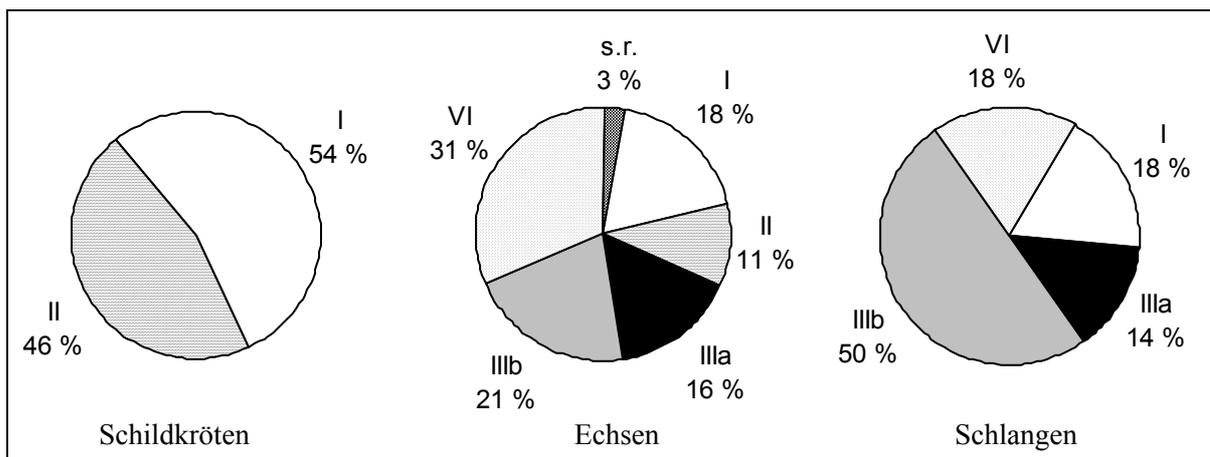


Die Verteilung dieser 86 Isolate auf die verschiedenen Salmonellen-Subspezies bei der jeweiligen Tiergruppe ist in Abbildung 22 zusammengestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass aus Schildkröten nur Serovare aus Subspezies I und II nachgewiesen wurden, jeweils zu fast gleichen Teilen.

Bei Schlangen macht Subspezies IIIb 50 % aus, die andere Hälfte verteilt sich beinahe gleichmäßig auf Vertreter aus den Subspezies I, IIIa und VI. Subspezies II wurde aus Schlangen nicht isoliert.

Bei Echsen wurden Salmonellen aus den Subspezies I, II, IIIa und b und IV isoliert. Ein Salmonellenstamm lag in serologischer Rauform vor, bei ihm konnte deshalb die Subspezieszugehörigkeit nicht bestimmt werden. Auch eine Antigenformel konnte deshalb für ihn nicht angegeben werden. Subspezies IV machte bei Echsen mit einem Drittel den Hauptanteil aus, Subspezies II kam mit nur ca. 10 % am seltensten vor. Subspezies I, IIIa und b haben einen fast gleichen Anteil von ca. 20 %.



**Abb. 22:** Vorkommen der verschiedenen Salmonellen-Subspezies bei den einzelnen Tiergruppen

**Abkürzungen:** s.r.: serologisch rau



## **5. DISKUSSION**

### **5.1 BESPRECHUNG DER METHODEN**

#### **5.1.1 Verwendete Salmonellenstämme**

Die 24 vom Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen zur Verfügung gestellten Salmonellenstämme waren vermutlich schon etwas älter und wurden möglicherweise bereits mehrmals überimpft. Daher kann eine Veränderung bezüglich Wachstumsverhalten und biochemischen Reaktionen nicht ganz ausgeschlossen werden, wie auch in der Literatur beschrieben wird (WILLIAMS SMITH, 1952; BAKER et al., 1972).

Die 42 Salmonellenstämme vom ZFF waren z.T. auch schon ca. vier Jahre alt, da sie aber als Stockkultur eingefroren und bei Bedarf portionsweise aufgetaut wurden, ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie sich stark verändert haben.

Die letzten 20 Salmonellenstämme, die erst bei der vorliegenden Untersuchung isoliert wurden, waren ganz frisch; sie wurden direkt nach ihrer Isolation und Identifikation auf den verschiedenen Nährböden getestet.

#### **5.1.2 Für die Bestimmung der Keimzahl angewendete Methoden**

##### **5.1.2.1 Zählmethode**

Die angewendete Methode der Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung und Auszählen der gewachsenen Kolonien ist sehr zeit- und arbeitsintensiv.

Andere Methoden wie z.B. photometrische Messung der Trübung der Bouillon oder Keimzählung mit einem Zytometer hätten sicherlich in kürzerer Zeit umfangreichere Messungen erlaubt. Auch hätten dann mehrere Salmonellenstämme getestet werden können, was ein noch aussagekräftigeres Ergebnis ermöglicht hätte. Jedoch kann bei diesen Methoden nicht zwi-



schen lebenden und abgestorbenen Bakterienzellen unterschieden werden. Bei der hier verwendeten Methode der Koloniezählung dagegen werden nur lebensfähige und koloniebildende Zellen berücksichtigt, die eine reelle Aussage über die tatsächliche Populationsdichte zulassen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass eventuelle Verunreinigungen durch Begleitkeime sofort auffallen.

### **5.1.2.2 Schätzmethode**

Für die Keimzahlbestimmung während des Wachstums von 42 weiteren Salmonellenstämmen wurde die Methode gewechselt, da es zu aufwändig gewesen wäre, von so vielen Stämmen geeignete Verdünnungen herzustellen, auf Nährböden auszuplattieren und zu zählen; auch wäre ein Platzproblem beim Bebrüten so vieler Agarplatten im Inkubator entstanden. Nach Meinung der Untersucherin war es aber auch nicht notwendig, die Zellzahl der Population ganz genau wissen. Es wurde für ausreichend gehalten, die Zellzahl größenordnungsmäßig festzustellen. Deshalb wurde eine Methode zur Abschätzung der Zellzahl ausgewählt. Auch bei dieser Methode werden nur vermehrungsfähige Bakterien erfasst. Die Reinheit der Versuchsstämme wurde stichprobenartig durch Ausstreichen auf feste Agarplatten kontrolliert.

Der Vergleich der beiden Methoden zur Keimzahlbestimmung brachte keine wesentlichen Unterschiede in der Größenordnung der ermittelten Keimzahlen; somit erschien die Anwendung der weniger aufwändigen Schätzmethode vertretbar.

### **5.1.3 Gewählte Zeitschritte**

Die Zeiteinheiten, zu denen die jeweiligen Keimzahlen bestimmt wurden, sind nicht immer ganz einheitlich. Sie schwanken zwischen zwei und sechs Stunden; dies hatte zumeist technische Gründe. Gegen Ende der Bebrütungsdauer wurde absichtlich aus Zeit- und Kostensparnis in größeren Zeitabständen gezählt bzw. mancher Versuch auch schon früher beendet, da erfahrungsgemäß dann keine rapiden Veränderungen in den Keimzahlen mehr zu erwarten sind. Es wurde aber darauf geachtet, dass zu Beginn der Bebrütung und während der logarithmischen Vermehrung bis zum Erreichen der maximalen Keimdichte und Eintritt in die stationäre Phase eine engmaschige Kontrolle durchgeführt wurde.



### **5.1.4 Getestete Temperaturstufen**

Die getesteten Temperaturstufen sollten die Vorzugstemperaturen von Reptilien und die in der Salmonellendiagnostik routinemäßig angewendeten Inkubationstemperaturen abdecken.

### **5.1.5 Ausgewählte Nährmedien**

Die Auswahl der Nährmedien richtete sich nach dem zu Beginn der Untersuchung durch Literaturstudium erworbenen Kenntnisstand.

#### **5.1.5.1 Flüssige Anreicherungsmedien**

##### **5.1.5.1.1 Voranreicherung**

Im ersten Teil der vorliegenden Untersuchung, dem Vorversuch, wurde ausschließlich mit frisch angesetzten, vermehrungsfähigen Kulturen im Wachstumsstadium gearbeitet.

In der zweiten Phase, der Feldstudie, wurden frisch gewonnene, maximal acht Stunden alte, gekühlte Kotproben untersucht. Eine Schädigung der Salmonellen durch negative Einflüsse, die die Fähigkeit zur Zellteilung beeinträchtigen, wie z.B. durch Eintrocknen, ist unter diesen Umständen sehr unwahrscheinlich.

Eine Voranreicherung dient vornehmlich der Wiederbelebung subletal geschädigter Bakterien, die sich in einem Selektivanreicherungsmedium eventuell nicht vermehren können; solche waren aber nicht zu erwarten, da gesunde und laut Vorbericht unbehandelte Schildkrötenpopulationen untersucht und die frischen Kotproben zügig weiterverarbeitet wurden. Deshalb wurde in dieser Studie auf eine Voranreicherung verzichtet.

##### **5.1.5.1.2 Selektivanreicherungsmedien**

##### **Für die Bestimmung einer geeigneten Bebrütungstemperatur**

Als allgemein gebräuchliche Salmonellen-Selektivanreicherungsmedien wurden das Anreicherungsmedium nach RAPPAPORT, nach RAPPAPORT und VASSILIADIS und die Selenit-Cystin-Selektivanreicherung gewählt. Alle drei Medien sind in der Handhabung sehr un-



kompliziert, da sie als Trockennährböden zu kaufen und leicht zuzubereiten sind. Die fertigen Medien sind gekühlt gut haltbar.

Die ursprünglich in die Untersuchung mit eingeschlossene Tetrathionatanreicherung wurde wieder verworfen, da sie sich als unbequem zu handhaben erwies: Das fertige Medium ist nicht haltbar, es muss stets neu zubereitet werden. Außerdem stellte sich heraus, dass beim Ausplattieren einer Salmonellenreinkultur aus diesem Medium auf Standard 1-Nähragar in der Mitte der Platten regelmäßig an der Stelle der stärksten Inokulation eine große, scharf begrenzte Zone ohne Koloniewachstum auftritt, die von einem Rand mit gut ausgebildeten, mehr oder weniger dichten Kolonien – je nach Keimdichte im Tetrathionatmedium – umgeben ist. Beim Ausplattieren einer 1:10-Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung wurde diese Hemmzone nicht festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Hemmzone auf die Wirkung der Anreicherungsbouillon zurückzuführen ist (eigene Beobachtungen). Ähnliches wurde von HARVEY & PRICE (1968 und 1979) bei der Kombination von Selenitanreicherung mit Ausstrich auf WS-Agar beobachtet und als additive Hemmung bezeichnet.

#### **Für die weitere Untersuchung**

Nachdem sich das Selektivanreicherungsmedium nach RAPPAPORT im Vorversuch als am wenigsten günstig für die Zellvermehrung von Salmonellen erwiesen hatte, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchung darauf verzichtet.

#### **5.1.5.2 Feste Selektiv- und Differenzierungsnährböden**

Aus den vielen auf dem Markt befindlichen festen Salmonellen-Selektiv- und Differenzierungsnährböden wurden neun mit unterschiedlich starker Hemmwirkung und verschiedenen Indikatorsystemen ausgewählt, die für die Isolierung und Differenzierung von Salmonellen aus Fäzes und anderem Material geeignet sind.

#### **5.1.6 Methode der Identifizierung salmonellenpositiver Kotproben**

Von gramnegativen, oxidasenegativen Stäbchen wurde ein API angelegt, ungeachtet einer typischen oder untypischen Kolonienmorphologie. Aus Zeit- und Kostengründen wur-



de allerdings von gleichartigen Kolonien auf einer Nährbodenplatte immer nur ein API angelegt, während von anderen Autoren drei verdächtige (WELLS et al., 1974; SIEBELING et al., 1975a und b; MICHLEL-MARLER, 1982; SIEBELING et al., 1985; GEUE & LÖSCHNER, 2002), 15 (BOYCOTT et al., 1953) oder sogar mindestens 50 Kolonien (WUTHE et al., 1979, FRICK, 1987) von jeder Platte untersucht wurden. Nach der Amtlichen Sammlung (L 00.0020, 1998) sollen bei der Lebensmitteluntersuchung mindestens fünf charakteristische Kolonien pro Platte biochemisch und serologisch bestimmt werden.

Aus dem selben Grund wurde auch nicht von allen Nährböden, auf denen eine Probe ausgestrichen wurde – sei es direkt oder nach Anreicherung – eine biochemische Differenzierung durchgeführt, sondern nur von einem Teil. Dies wurde von Fall zu Fall entschieden, je nachdem, wie viele verschiedenartige Kolonien sich auf den jeweils verwendeten Nährböden gebildet hatten, auf welchem Nährboden die Kolonien leichter unterscheidbar oder besser isoliert waren. Nach Möglichkeit wurde der API von Kolonien vom BPLS-Agar angelegt, da von der Routinediagnostik her keine Interaktionen des BPLS-Agars mit dem biochemischen Testsystem zu erwarten waren.

Ebenso wurde aus einer einmal positiv getesteten Kotprobe auch im weiteren Untersuchungsverlauf kein weiterer API angelegt. Daher kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob eine z.B. im Direktausstrich bereits als salmonellenpositiv identifizierte Probe auch noch nach 24 oder 48 Stunden in einem der beiden Anreicherungsmedien oder in beiden und auf allen ausgestrichenen Platten tatsächlich Salmonellenkolonien hervorbrachte; es kann nur angegeben werden, ob sich salmonellenverdächtige Kolonien gebildet haben, die bei der Routineuntersuchung erkannt würden, oder ob unverdächtige Kolonien entstanden, die als falsch negative Proben unentdeckt bleiben. Eine ähnliche Methode wurde von LIEBER (1982) für die Optimierung der Nährbodenkombination bei der Stuhluntersuchung des Menschen auf Salmonellen angewendet.

### **5.1.7 Beurteilung der Nährböden nach ihrer Eignung für die Identifikation von Reptiliensalmonellen**

Aufgrund der beschriebenen Identifizierungsmethode salmonellenpositiver Kotproben wurde die Eignung der einzelnen Nährböden zur Differenzierung von Salmonellen aus Reptilien



danach bewertet, ob die positiven Proben auch verdächtige Kolonien bildeten, also positive Ergebnisse brachten, oder unverdächtige Kolonien und demnach falsch negative Ergebnisse.

Entsprechend wurde beurteilt, ob die negativ getesteten Proben auf den jeweils eingesetzten Nährböden auch unverdächtige Kolonien, also negative Ergebnisse, oder verdächtige Kolonien, also falsch positive Ergebnisse anzeigten.

### **5.1.8 Nährbodenauswahl für Kotuntersuchung**

Die Auswahl der Nährmedien, auf denen die Kotproben letztendlich direkt und nach Anreicherung in den Selektivanreicherungsmedien ausgestrichen wurden, richtete sich nach folgenden Kriterien:

Der RAMBACH-Agar wurde ausgeschlossen, da sich dieser sehr teure Nährboden im Vorversuch mit Salmonellenreinkulturen für die Identifizierung von Salmonellen aus den Subspezies IIIa und b und IV als unzuverlässig erwiesen hat.

Auf den SS-Agar wurde verzichtet, weil sich bei der Untersuchung von 66 Salmonellenstämmen herausgestellt hatte, dass er fast identische Ergebnisse wie der BPLS-Agar geliefert hatte. Unter allen 86 insgesamt untersuchten Salmonellenstämmen unterschieden sich diese beiden Nährböden nur in der Morphologie von zwei Isolaten (siehe Tabellenanhang).

Der BPLS-Agar wurde mit Ausnahme der ersten beiden Kotproben ständig mitgeführt, da er erstens einer der „Standardnährböden“ in der Routinediagnostik am ZFF ist und deshalb mit ihm die meisten Erfahrungen vorliegen, weil er zweitens sowohl in der Lebensmitteluntersuchung (L 00.0020, 1998) als auch für die Stuhluntersuchung des Menschen (KIST et al., 2000) empfohlen wird und drittens außerdem von vielen Autoren als günstig bewertet wird (BANWART & AYRES, 1953; EDEL & KAMPELMACHER, 1969; LIEBER, 1982).

Die übrigen Nährböden, DCLS-, HE-, ÖNÖZ-, WS- und XLD-Agar wurden in verschiedenen Kombinationen eingesetzt, möglichst immer die gleiche Kombination für einen gesamten Schildkrötenbestand.



## 5.2 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

### 5.2.1 Ermittlung einer geeigneten Inkubationstemperatur für die Selektivanreicherung

Von vielen Autoren wird eine erhöhte Inkubationstemperatur von 42 bzw. 43°C für die Isolation von Salmonellen bevorzugt und weiterempfohlen (HARVEY & PRICE, 1953; SPINO, 1966; HARVEY & PRICE, 1968; EDEL & KAMPELMACHER, 1969; NABBUT, 1972). Wie in den Abbildungen 14 (S. 93) und 15 (S. 94) ersichtlich ist, kann dies keinesfalls für Salmonellen aus Reptilien unbesehen übernommen werden. Da die Bebrütung der Selektivanreicherung bei einer erhöhten Temperatur Begleitkeime in ihrem Wachstum stärker hemmt als Salmonellen und diese dadurch beim nachfolgenden Ausstrich auf einem festen Agar leichter identifiziert werden können, sollte dieser Vorteil genutzt werden, indem eine möglichst hohe Inkubationstemperatur gewählt wird; diese darf aber auf keinen Fall einen schädigenden Einfluss auf die gesuchten Bakterien, die Salmonellen, haben.

#### 5.2.1.1 Wachstumsverlauf des Versuchsstammes NRL-SALM 2509

Bei der Untersuchung des Wachstumsverlaufes des Salmonellenstammes NRL-SALM 2509 wurde festgestellt, dass in allen drei verwendeten Selektivanreicherungsmedien die Zellvermehrung dieses Stammes bei 42 °C deutlich langsamer war als bei niedrigeren Temperaturen. R eignet sich nicht für die Bebrütung bei einer Temperatur von 42 °C; das wird in der Literatur beschrieben (RHODE et al., 1985) und kann hier bestätigt werden. Da dieses Medium das Wachstum des Versuchsstammes bei allen untersuchten Temperaturen generell am wenigsten unterstützte, wurde es von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

Bei 28 °C, einer Temperatur, die der Vorzugstemperatur zumindest einiger Reptilien entspricht (GABRISCH & ZWART, 1998; ZWART, 1998a,b), ist das Wachstum des untersuchten Salmonellenstammes ebenfalls verzögert. Bei den Temperaturstufen 35 und 37 °C, in S auch noch bei 40 °C, fand die schnellste Vermehrung des Versuchsstammes statt. Dies entspricht eher Temperaturen, wie sie bei homoiothermen Tieren vorherrschen; unter den Reptilien werden sie nur von einigen sonnenliebenden Arten bevorzugt, sonst werden sie kaum,



und dann auch nicht über einen längeren Zeitraum hinweg gefunden. Beim Sonnenbaden können kurzzeitig höhere Temperaturen erreicht werden, auf Dauer sind sie jedoch für die meisten Reptilien schädlich (GABRISCH & ZWART, 1998; ZWART, 1998b).

#### **5.2.1.2 Wachstumsverhalten von weiteren Versuchsstämmen bei 42 °C in RV**

Bei der Isolation von Salmonellen kommt es nicht nur darauf an, wie gut sich die gesuchten Bakterien vermehren können, sondern auch, wie gut sich eventuell vorhandene, störende Begleitflora im gleichen Medium vermehren kann oder eben gehemmt wird. Generell vertragen Salmonellen höhere Bebrütungstemperaturen besser als üblicherweise neben ihnen vorliegende Begleitkeime (SPINO, 1966; NABBUT, 1972).

Darum wurde die Wachstumsfähigkeit von 65 weiteren aus Reptilien isolierten Salmonellenstämmen in RV nicht bei dem im vorangegangenen Experiment festgestellten, hinsichtlich der Vermehrungsrate optimalen Temperaturbereich von 35 bis 37 °C getestet, sondern bei der kritischen Temperatur von 42 °C.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war sehr interessant: Fast 75 % der getesteten Subspezies IIIb-Stämme (14 von 19) vermehrten sich in RV bei 42 °C nicht oder nur schlecht. In den anderen Subspezies macht der Anteil der sich unter diesen Bedingungen nur schlecht vermehrenden Salmonellenstämmen zwischen 12 % bei IIIa und maximal 23 % bei I aus.

Nach eigenen Beobachtungen (unveröffentlicht) konnten sich alle Stämme, die bei 42 °C in RV nur nach mehrfachen Wiederholungen anzuzüchten waren, im gleichen Medium bei 40 °C ohne Schwierigkeiten auf die erwartete Zelldichte von über  $10^8$  Keimen/ml vermehren.

#### **5.2.1.3 Fazit**

Somit lässt sich also feststellen, dass eine Bebrütungstemperatur von 42 °C für die Anzucht von Salmonellen aus Reptilien in dem Medium nach RAPPAPORT und VASSILIADIS zumindest nicht die optimale, eher dagegen die kritische maximale Temperatur darstellt, da ein gewisser Anteil der in den Proben nachzuweisenden Salmonellen hierbei nicht wächst. Besonders groß ist dieser Anteil unter den Subspezies IIIb-Salmonellen; diese machen jedoch bei Reptilien einen vergleichsweise hohen Prozentsatz aus. MADSEN (1994) berichtet, dass sich bei ihm einige Arizonakeime in RV nicht vermehrten; die von ihm einge-



stellte Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Auch in der Selektivanreicherungsbouillon nach RAPPAPORT, die für alle Darmkeime bei 42 °C toxisch ist (RHODES et al., 1985), wuchsen bei VASSILIADIS (1968) bei einer Temperatur von 37 °C nur drei von elf getesteten Arizonastämmen.

Um zu vermeiden, dass bei einer Untersuchung viele Salmonellen der hohen Temperatur zum Opfer fallen, sollte man bei der Bebrütung von RV unterhalb dieser kritischen Temperatur von 42 °C bleiben. Da bei 40 °C keinerlei Schwierigkeiten in der Vermehrung der getesteten Salmonellenstämme beobachtet werden konnte, die Hemmung der Begleitflora bei einer hohen Temperatur nach Möglichkeit aber ausgenutzt werden sollte, ist vorläufig eine Temperatur von 41 °C zu empfehlen; dies sollte in weiteren Untersuchungen noch abgesichert werden.

In der Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon war bei dem getesteten Salmonellenstamm NRL-SALM 2509 bei keiner Temperatur ein schlechtes Wachstum aufgetreten. Zusätzliche Stämme wurden in diesem Medium nicht getestet. CARLSON & SNOEYENBOS (1972) fanden für *Salmonella* Typhimurium in einem nicht selektiven flüssigen Nährmedium die kürzeste Generationszeit und höchste maximale Keimdichte bei 41 °C. In der von ihnen verwendeten Selenit-Brillantgrün-Anreicherung war die Generationszeit bei 37 °C kürzer und die maximale Keimdichte höher als bei 41 °C; gleiches gilt auch für die Tetrathionat-Brillantgrün-Anreicherung. In der Literatur werden Selenitanreicherungsmedien sowohl bei 37 als auch bei 43 °C (IVESON, 1973) erfolgreich eingesetzt; bei der Lebensmitteluntersuchung (L 00.00-20; 1998) wird das Selenit-Cystin-Medium bei 35 oder 37 °C inkubiert. In der vorliegenden Untersuchung konnte für dieses Medium bei 37 °C ein sehr gutes Wachstum beobachtet werden; deshalb wurde es im weiteren Verlauf der Untersuchung bei 37 °C bebrütet.

Viele Autoren betonen, dass sich kein Selektivanreicherungsmedium für sämtliche der über 2400 heute bekannten Salmonellenserovare gleichermaßen eignet (BANWART & AYRES, 1953; IVESON & MACKAY-SCOLLAY, 1969; HARVEY & PRICE, 1976; HARVEY et al., 1983; MADSEN, 1994). Deshalb sollte stets eine Kombination von wenigstens zwei verschiedenen selektiven Anreicherungsmedien eingesetzt werden. Dies gilt umso mehr bei Reptilien, bei denen Salmonellen aus allen Subspezies in großer Variationsbreite zu finden sind.



### 5.2.2 Einfluss der Begleitflora auf das Wachstum und die Isolierbarkeit von Salmonellen aus dem Selektivanreicherungsmedium

In diesem Experiment wurde der Salmonellenstamm ZFF 1230/99 mit frischem Kot von zwei Schildkröten in S bei 37 °C und RV bei 41 °C insgesamt 48 Stunden inkubiert. Zum Zeitpunkt der Beimpfung und nach 12, 24 und 48 Stunden wurde die Dichte der Salmonellenpopulation und die der Begleitflora bestimmt.

Normalerweise liegen Salmonellen im Untersuchungsgut in sehr geringer Keimzahl vor, Begleitkeime dagegen in großer. Deshalb setzt man eine Selektivanreicherung ein, um die Begleitflora zu dezimieren, die Salmonellen jedoch nicht oder zumindest weniger stark zu hemmen oder sogar im Wachstum zu fördern. Auf diese Weise verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der Salmonellen, so dass diese dann im Ausstrich auf einem festen Nährmedium erkannt werden können, wo sie ohne selektive Anreicherung von der Begleitflora überwuchert und dadurch maskiert würden und so bei der Untersuchung entgehen. Unvorhergesehenerweise war im Kot von beiden Schildkröten, der für diesen Kontaminationsversuch verwendet wurde, sehr wenig Begleitflora vorhanden. Schon im Direktausstrich wuchsen nur einzelne Kolonien, während üblicherweise im ersten Teil eines Dreiösenausstriches durchaus ein dichter Bakterienrasen bzw. konfluierende Kolonien gefunden wurden; eine genauere Auswertung in dieser Hinsicht war nicht durchgeführt worden. Ursache für die geringe Menge an Fäkalflora bei den Schildkröten könnte eventuell der Untersuchungszeitpunkt Ende September sein, einer Zeit, in der sich Landschildkröten normalerweise auf den Winterschlaf vorbereiten. Die für diesen Versuch ausgewählten Schildkröten wurden jedoch zu diesem Zeitpunkt in einem beheizten Gewächshaus gehalten, waren munter und fraßen regelmäßig.

In den meisten Arbeiten, die sich mit der hemmenden Wirkung von Salmonellen-Selektivanreicherungen befassen, werden natürliche Verhältnisse imitiert und die Medien mit kleinen Salmonelleninokula und viel Begleitflora beimpft, z.B. mischten RAPPAPORT et al. (1956) ca.  $10^{4,5}$  *E. coli*/ml mit etwa 10 Salmonellen/ml, RHODES et al. (1985)  $10^6$  Keime/ml einer Mischflora aus *E. coli*, *Proteus vulgaris* und *Pseudomonas aeruginosa* mit 100-1000 *Salmonella* Typhimurium/ml.

Vergleichbare Verhältnisse wie in der vorliegenden Studie finden sich jedoch bei CARLSON & SNOEYENBOS (1972), die natürlicherweise mit *Salmonella* Typhimurium kontaminierte



Geflügeleinstreu nach Anreicherung in einem Selenit-Selektivanreicherungsmedium, Selenit-Brillantgrün-Sulfapyridin, untersuchen. Bei fast identischem Wachstumsverlauf haben bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C sowohl die Salmonellen als auch die Begleitkeime nach etwas über 24 Stunden ihre maximale Populationsdichte erreicht; ihr Wachstumsverlauf ist sehr ähnlich, was bedeutet, dass ihre Generationszeit in diesem Medium fast gleich ist. Die Salmonellen entwickeln jedoch eine niedrigere maximale Keimzahl, sie liegt eine Zehnerpotenz unter der der Begleitflora. Bei 43 °C dagegen weisen bei nahezu identischem Wachstumsverlauf die Salmonellen mit über  $10^8$  Keimen/ml eine deutlich höhere Keimdichte auf als die Begleitflora mit unter  $10^7$  Keimen/ml, die nach 48 Stunden sogar auf ca.  $10^{5,5}$  absinkt, während die der Salmonellen konstant bleibt. Nach 24 Stunden besteht also eine Differenz von über einer Zehnerpotenz zugunsten der Salmonellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die maximale Zelldichte von Salmonellen und Begleitkeimen in S schon nach 12 Stunden erreicht. Im Kot von Schildkröte 1 war die Salmonellenzahl ca. eineinhalb Zehnerpotenzen größer als die der Begleitflora, somit könnten die Salmonellen zu diesem Zeitpunkt beim Ausstrich auf einem selektiven Nährboden erfolgreich nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Bebrütung ändert sich das Verhältnis der Salmonellen zur Begleitflora, nach 48 Stunden sind etwa hundertmal mehr Begleitkeime in der Anreicherung vorhanden als Salmonellen. Somit werden Salmonellen – in Abhängigkeit von der Selektivität des Nährbodens – bei einem Ausstrich zu diesem Zeitpunkt vermutlich von Begleitkeimen überwuchert und nicht erkannt; bei Schildkröte 2 dominiert bereits nach 12 Stunden die Begleitflora über die Salmonellen.

Dies bestätigt zum einen die Feststellung von MCCOY (1962), dass der optimale Ausstrichzeitpunkt eine Funktion der Anzahl der in der Probe vorhandenen Salmonellen darstellt und mit ihr variiert, also keine einheitlichen Empfehlungen gegeben werden können, und zu anderen die Tatsache, dass die selektive Hemmwirkung von Selenit auf Begleitflora relativ schwach ist. Die in der Selenitanreicherung identifizierten Begleitkeime waren *Citrobacter* spp. und *Enterobacter* spp., die auch bei SMITH (1959) und LAPAGE & BASCOMB (1968) bzw. HUGHUES et al. (1978) von Selenit nicht gehemmt werden.

Die selektive Hemmung von RV ist bedeutend besser, bei beiden Schildkröten überwiegt nach 12 und 24 Stunden die Salmonellenpopulation über die Begleitflora. Dabei ist die Differenz bei Schildkröte 1 nach 12 Stunden größer (dreieinhalb Zehnerpotenzen, also über 3000-fach), bei Schildkröte 2 nach 24 Stunden (zwei Zehnerpotenzen); bei beiden



Schildkröten müsste die Identifizierung von Salmonellen bei einem Ausstrich nach 24 Stunden erfolgreich sein. Nach 48 Stunden hingegen sind gleich viele Begleitkeime vorhanden wie Salmonellen bzw. bei Schildkröte 2 sogar etwas mehr Begleitflora; zu diesem Zeitpunkt ist eine Isolation von Salmonellen beim Ausstrich schwierig. RHODES & QUESNEL (1986) untersuchen die selektive Wirkung von RV auf Begleitflora in Klärschlamm. Sie stellen nach 24 Stunden Bebrütung eines 0,1 ml großen Inokulums aus einer nicht selektiven Voranreicherung in RV bei 42 °C ca. 600 mal mehr Salmonellen fest als Begleitflora. Die Ausgangskeimzahlen betragen für die Begleitflora ungefähr  $10^6$ , für die Salmonellen ca. 10 Keime/ml. Eine längere Inkubation als 24 Stunden wurde von ihnen nicht durchgeführt, deshalb kann bei diesen Autoren weder über das weitere Wachstumsverhalten von Salmonellen noch von Begleitkeimen eine Aussage gemacht werden.

Nach VAN SCHOTHORST & RENAUD (1982) ist eine Selektivanreicherung nur dann sinnvoll, wenn ein Bakterium isoliert werden soll, das im Verhältnis zur Begleitflora in einer deutlichen Minderheit vorliegt. Dies war in dem vorliegenden Versuch nicht der Fall. Vermutlich wären in der hier geschilderten Situation die Salmonellen auch schon im Direktausstrich entdeckt worden. Da man aber im Voraus nie weiß, wie viel Begleitflora und ob und wie viele und welche Salmonellen in einer Probe vorhanden sind, sollte immer ein Direktausstrich und eine Anreicherung angelegt werden. Aus der Anreicherung sollten wenigstens zwei Ausstriche zu verschiedenen Zeiten angelegt werden, z.B. zwischen 12 und 24 Stunden und nach 48 Stunden; die längere Bebrütungsdauer ist dann sinnvoll, wenn viel Begleitflora und wenige Salmonellen vorhanden sind, um den Salmonellen genügend Zeit zu geben, sich auf die für den Nachweis im Ausstrich mindestens notwendige Keimzahl von  $10^4$ /ml zu vermehren, und die Begleitflora zu reduzieren (VAN SCHOTHORST & RENAUD, 1982).

Um über den Einfluss der Begleitflora im Selektivanreicherungsmedium auf das Wachstum von Salmonellen aus Reptilien allgemein und aus Landschildkröten im Besonderen noch fundiertere Aussagen machen zu können, vor allem, wenn sie im Übermaß vorliegt, sollten hier noch weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden. Anzustreben wäre dabei sicherlich, nativen Schildkrötenkot für die Kontamination zu verwenden, wie in dieser Untersuchung, entsprechend den Arbeiten von CARLSON & SNOEYENBOS (1972) bei Geflügeleinstreu oder RHODES & QUESNEL (1986) bei Abwasserproben, und nicht einen „Cocktail“ verschiedener, im Labor in Reinkultur angezüchteter und dann in bestimmtem Verhältnis



zusammengemischter Begleitorganismen wie bei MULINDWA & PIETZSCH (1979) oder RHODES et al. (1985).

### 5.2.3 Ermittlung geeigneter Selektiv- und Differenzierungsnährböden

#### 5.2.3.1 Ergebnis des Experimentes mit Reinkulturen

Bei der Untersuchung von 86 Salmonellenisolaten in Reinkultur auf neun verschiedenen Salmonellen-Selektiv- und -Differenzierungsnährböden bestätigte sich die Erkenntnis von IVESON (1971), RHODES & QUESNEL (1986) und VAN SCHOTHORST et al. (1987), dass es keinen Nährboden gibt, der sich für die Isolation und Identifikation aller Salmonellen-Subspezies oder -Serovare gleichermaßen eignet.

Während der Nachweis von Subspezies I-Salmonellen in der Regel ohne Schwierigkeiten auf allen getesteten Nährböden gelang – nur eine Isolat war dabei, das auf allen Nährböden untypische Kolonien bildete – traten in den anderen Subspezies teilweise beträchtliche Unterschiede in der Eignung der Nährböden auf.

Am wenigsten zuverlässig war hier der RAMBACH-Agar. Dieser Nährboden mag für die Identifikation von Salmonellen in einem Routinelabor für menschliche Stuhluntersuchung durchaus geeignet sein, da die dort vorherrschenden Subspezies I-Salmonellen aufgrund ihrer leuchtend roten Farbe tatsächlich sehr leicht zu erkennen sind. GRUENEWALD et al. (1991) testeten den RAMBACH-Agar an 292 Salmonellenisolaten, von denen lediglich 22, ca. 8 %, keine leuchtend roten Kolonien entwickelten. Diese Zahl dürfte, so die Autoren, niemanden von der Verwendung dieses Nährbodens abschrecken, weil darunter acht Isolate waren, die nur ganz selten vorkommen und deshalb nahezu bedeutungslos sind, weiterhin acht *Salmonella* Typhi-Isolate, für die der Agar nach Aussage von RAMBACH (1990) selbst nicht geeignet ist, und zwei *Salmonella* Paratyphi A-Isolate, für die er ebenfalls ungeeignet ist. RAMBACH (1990) erhielt bei 79 von 100 Nichttyphus-Isolaten leuchtend rote Kolonien. Für einen Einsatz in der Salmonellendiagnostik bei Reptilien hat sich der RAMBACH-Agar aber als ungenügend erwiesen. Tatsächlich ist er sogar der am wenigsten geeignete Nährboden von allen untersuchten, da er gerade die in dieser Tierklasse häufig vorkommenden Subspezies IIIb- und IV-Salmonellen nicht und von den Subspezies IIIa-Salmonellen gerade einmal 10 % enttarnt.



Auch der Wismutsulfid-Agar erfüllte nicht die in ihn gesetzten Erwartungen, da nicht alle Subspezies IIIb-Serovare auf ihm typische Kolonien bildeten; ungefähr ein Drittel der Isolate aus dieser Subspezies wuchs in untypischer Morphologie. IVESON (1971) berichtet ebenfalls, dass einige Arizonakeime auf diesem Nährboden dunkelgrüne Kolonien mit blassgrünem Hof ohne den typischen Metallglanz entwickeln. Abgesehen davon wären auch einige Stämme aus den Subspezies IIIa und IV unerkant geblieben, die auf anderen Nährböden problemlos erkannt wurden. Dennoch sollte der WS-Agar für die Identifikation von Subspezies IIIb-Salmonellen als zusätzlicher, nicht auf Laktosespaltung als Indikatormechanismus beruhender Selektiv- und Differenzierungsagar eingesetzt werden.

Ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis wurde mit dem MLCB-Agar erzielt, über den kaum Berichte in der Literatur vorliegen. Einzig VAN SCHOTHORST et al. (1987) empfehlen ihn, besonders wenn laktosepositive Salmonellen zu erwarten sind. In der vorliegenden Untersuchung zeigten zwar vereinzelt Stämme aus den Subspezies II, IIIa und IV untypisches Wachstum auf diesem Agar, während sie auf anderen Nährböden in typischen und somit verdächtigen Kolonien wuchsen, doch mit einem Anteil von fast 80 % typischer Kolonien unter den getesteten Subspezies IIIb-Stämmen und über 91 % typischer Kolonien unter allen Salmonellenstämmen überragt er die anderen Nährböden eindeutig. Somit sollte er unbedingt in die Salmonellendiagnostik bei Reptilien – zumindest bei Echsen und Schlangen, bei denen häufiger mit Subspezies IIIb gerechnet werden muss (siehe Abb. 22, S. 123) – Eingang finden.

Bei den übrigen Nährböden traten lediglich geringfügige Differenzen auf, hier kann der Untersucher nach persönlichen Präferenzen auswählen. Mit allen Nährböden können weniger als die Hälfte der Subspezies IIIb-Salmonellen erkannt werden. Insgesamt leichte Vorteile bringt der HE-Agar; der BPLS- und SS-Agar waren sich sehr ähnlich, doch erlaubt der BPLS-Agar ein stärkeres Wachstum und die Bildung größerer Kolonien als der SS-Agar. Der DCLS- und der ÖNÖZ-Agar waren etwas weniger leistungsfähig; hier unterstützt der ÖNÖZ-Agar das Salmonellenwachstum besser, indem er mehr und größere Salmonellenkolonien hervorbringt. Zwar mit nur wenig Abstand, aber trotzdem dahinter rangiert mit 83 % typischen Kolonien der XLD-Agar. Somit steht er zusammen mit dem WS-Agar an letzter Stelle, doch hat dieser den Vorteil einer höheren Subspezies IIIb- Entdeckungsrate.

Besonders interessant ist, dass mit der Kombination von MLCB mit den anderen Nährböden außer dem RAMBACH-Agar alle Salmonellenstämmen bis auf zwei, die auf allen Nährböden



untypisch wuchsen, identifiziert werden konnten. Die Fähigkeit des MLCB-Agars, die meisten Subspezies IIIb-Salmonellen kenntlich zu machen, ergänzt sich mit der Leistungsfähigkeit von BPLS, HE und SS, die alle Stämme der Subspezies I, II, IIIa und IV identifizieren konnten – mit Ausnahme des einen Stammes aus Subspezies I, der auf keinem Nährboden erkannt werden konnte. Somit würde eine Kombination von MLCB mit BPLS, HE oder SS den höchsten Salmonellenertrag bringen und die meisten Ausfälle des einzelnen Nährbodens kompensieren.

Für eine Routineuntersuchung von Reptilien auf Salmonellen könnten nach den hier durchgeführten Experimenten mit Reinkulturen der BPLS-, HE-, ÖNÖZ- und SS-Agar empfohlen werden, wenn mit Subspezies IIIb nicht unbedingt gerechnet werden muss, wie z.B. bei Schildkröten (siehe Abb. 22, S. 123). Bei Echsen und vor allem Schlangen aber, bei denen die genannte Subspezies mit 50 % doch einen ganz erheblichen Anteil ausmachen, sollten auf jeden Fall der MLCB- oder auch der WS-Agar mitgeführt werden.

### **5.2.3.2 Ergebnis der Kotuntersuchung**

#### **5.2.3.2.1 Feste Selektiv- und Differenzierungsmedien**

Da es für die Auswahl eines geeigneten Nährbodens nicht nur wesentlich ist, ob Salmonellen darauf in typischer Art und Weise wachsen, sondern auch, ob und in welchem Ausmaß Begleitflora darauf wächst, und ob die Kolonien unterscheidbar sind, soll das Ergebnis des Feldversuches in Hinblick darauf erörtert werden.

Aufgrund der geringen Anzahl salmonellenpositiver Proben ist es nicht sinnvoll, diejenigen Nährbodenplatten, auf denen Salmonellen diagnostiziert wurden, denen gegenüberzustellen, auf denen sie nicht erkannt wurden. Es soll vielmehr unter dem Aspekt, möglichst alle Salmonellen zu erkennen und dabei unnötigen zusätzlichen Laboraufwand so gering wie möglich zu halten, versucht werden, durch Vergleich der falschpositiven Ergebnisse auf Platten mit negativen Proben und der falschnegativen Ergebnisse auf Platten mit positiven Proben, einen Nährboden zu finden, der für die Isolation und Identifikation von Salmonellen aus Schildkröten geeignet ist.



### Positive Proben

In diesem Experiment erwies sich der BPLS-Agar als zuverlässiges Medium für die Identifikation von Salmonellen, da er sowohl im Direktausstrich mit 48 % als auch nach Anreicherung in RV nach 24 bzw. 48 Stunden mit 95 bzw. 100 % die meisten Proben als verdächtig enttarnte. Kombiniert mit der Selenitanreicherung ist dieser Nährboden deutlich weniger leistungsfähig; nach 24 Stunden brachte er 37 %, nach 48 Stunden 58 % verdächtige Proben. Hier eignet sich der XLD-Agar mit 69 % nach 24 und 48 Stunden eher, der auch nach der RV-Anreicherung nur knapp hinter dem BPLS-Agar rangiert; allerdings zeigte der XLD-Agar im Direktausstrich etwa ein Drittel weniger verdächtige Proben an als der BPLS-Agar.

In Bezug auf falsch negative, d.h. unverdächtige Proben brachten beide Nährböden in Kombination mit RV mit nur 5 und 6 % nach 24 Stunden und 0 % nach 48 Stunden eine sehr gute Leistung, während im Direktausstrich auf beiden Nährböden relativ viele Proben falschnegativ erscheinen. Auf BPLS ist es ein Drittel, auf XLD über die Hälfte aller positiven Proben; damit steht der BPLS-Agar im Direktausstrich immer noch an zweiter Stelle, nur der WS-Agar bringt weniger falschnegative Ergebnisse, aber auch das sind immerhin 14 %. Der XLD-Agar steht mit dem HE-Agar fast gleichauf an letzter Stelle mit 56 bzw. 57 % unverdächtige Proben.

Nach Anreicherung in S erscheinen auf allen vier in dieser Kombination getesteten Nährböden deutlich mehr Proben fälschlicherweise unverdächtig als nach RV-Anreicherung. Die Ergebnisse sind nach 24 und 48 Stunden Bebrütung relativ heterogen, weshalb schwer auszuwerten ist, welcher Nährboden sich hier am besten eignet. Jedenfalls sind nach 48 Stunden eher mehr Proben falsch negativ als nach 24 Stunden, was im Gegensatz zu den Verhältnissen nach Anreicherung in RV steht und gegen eine auf 48 Stunden verlängerte Bebrütungszeit der Selenitanreicherung spricht. Dies bestätigt die Ergebnisse des „Kontaminationsversuches“ (siehe Abb. 18 und 19, S. 100 und Kap. 5.2.2, S. 133), wo die Wahrscheinlichkeit, im Ausstrich Salmonellen nachweisen zu können, ebenfalls nach 48 Stunden geringer ist als nach 12 bis 24 Stunden, zumindest in dem Fall, wenn von Anfang an wenig Begleitflora vorhanden ist. Ob dann eine Selektivanreicherung aber überhaupt sinnvoll ist, wurde in Abschnitt 5.2.2 (S. 133) besprochen; eventuell gelingt der Nachweis dann leichter im Direktausstrich. Doch da man im Voraus nie weiß, wie viel Begleitflora und Salmonellen in der Probe vorhanden sind, ist es empfehlenswert, immer einen Direktausstrich und eine Anreicherung zu machen.



### **Negative Proben**

Auch bei diesen Proben brachte der BPLS-Agar im Direktausstrich mit Abstand die meisten verdächtigen, die hier aber als falsch positiven bewertet werden müssen. Dies bedeutet einen erheblichen Mehraufwand im Labor aufgrund der notwendigen weiteren Differenzierung solcher Kolonien. Nach Anreicherung in RV und S gleichen sich die Zahlen der fälschlicherweise verdächtig erscheinenden Proben auf allen eingesetzten Nährböden einander an, wobei nach der Selenitanreicherung deutlich mehr verdächtige Kolonien entstehen, die Hemmwirkung auf störende Begleitflora also geringer ist als in RV.

Insgesamt bringt der XLD-Agar hier die wenigsten verdächtigen, falsch positiven Ergebnisse und benötigt somit den geringsten Laboraufwand für nachfolgende Differenzierung.

### **Fazit**

Zwar muss der Aufwand an Arbeit und Material, der nötig ist, um bei einer Untersuchung zu einem Ergebnis zu finden, aus wirtschaftlichen Gründen berücksichtigt werden; aber das Wesentliche, worauf es ankommt, ist, ob die gestellte Frage beantwortet werden kann. Dafür müssen geeignete Mittel gewählt werden.

Um zu klären, ob bei einem Tier eine Infektion mit einem Erreger vorliegt, der doch recht leicht – auch auf den Menschen (siehe 2.1.5.2, S. 38) – übertragbar zu sein scheint (siehe 5.2.6, S.146), auch wenn einige Autoren anderer Meinung sind (DIMOW, 1965a; PRUKSARAJ, 1967; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; WUTHE et al., 1979), sollten gewisse Anstrengungen durchaus vertretbar sein. Deshalb wird in dieser Studie, ähnlich wie bei LIEBER (1982), am meisten Gewicht darauf gelegt, mit welchem Nährmedium bzw. mit welcher Kombination mehrerer Nährmedien möglicherweise in einer Probe vorhandene Salmonellen am sichersten entdeckt werden können, auch wenn unter Umständen einige Proben zunächst falsch positiv beurteilt werden und erst nach weiterer Differenzierungsarbeit als tatsächlich negativ diagnostiziert werden können. Der Minimierung des Arbeitsaufwandes, die zwangsläufig einen Verlust von positiven Proben mit sich bringt, wird hier weniger Wert beigemessen.

Diesen Anforderungen – die meisten positiven Proben als verdächtig kenntlich zu machen – entspricht am ehesten der BPLS-Agar, auch wenn auf diesem gleichzeitig die meisten falsch positiven Proben erscheinen. An zweiter Stelle steht der XLD-Agar, der insbesondere nach



Anreicherung in S die meisten verdächtigen Proben brachte. Ein weiterer Vorteil dieses Nährbodens ist, dass er generell die wenigsten falsch positiven Ergebnisse erzeugte.

Bestätigt wird diese theoretische Einschätzung dadurch, dass bei der tatsächlichen Identifizierung der positiven Proben die meisten auf BPLS und XLD entdeckt wurden (siehe Tab. 13, S. 110).

Die hier festgestellte Eignung des BPLS-Agars deckt sich auch mit den Ergebnissen der Anzucht von Salmonellenstämmen in Reinkultur (siehe Abb. 20, S. 108 und Kap. 5.2.3.1, S. 136) und mit den Angaben in der Literatur, in der dieser Nährboden häufig die beste Beurteilung erhält. Der XLD-Agar, der im Vorversuch mit den Reinkulturen eher schlecht abgeschnitten hatte, erwies sich in der Praxis mit natürlicher Begleitflora als durchaus effektiv. Dies bestätigt die Aussage von VASSILIADIS et al. (1974), dass Ergebnisse mit Reinkulturen oder künstlicher Kontamination nicht ohne weiteres auf natürliche Bedingungen übertragbar sind.

Allerdings muss bei der abschließenden Bewertung der Nährböden daran erinnert werden, dass neben 167 Landschildkröten nur zwei Echsen untersucht wurden und die gefundenen Salmonellenisolate alle außer einem zu den Subspezies I und II gehören, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Reaktionen relativ salmonellentypisch verhalten und auf den verwendeten Nährböden typische Kolonien bilden und somit generell keine großen Schwierigkeiten bei der Identifikation bereiten. Das Ergebnis der hier durchgeführten Studie darf nicht auf die Untersuchung von Reptilien allgemein – insbesondere Schlangen und Echsen – übertragen werden, bei denen vermehrt mit Subspezies IIIa und b und IV gerechnet werden muss. Für den Salmonellennachweis aus diesen Tieren eignen sich möglicherweise andere Nährböden wie z.B. der MLCB- oder WS-Agar besser, wie sich im Versuch mit den Reinkulturen erwiesen hat; dies sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### **5.2.3.2.2 Flüssige Selektivanreicherungsmedien**

##### **Anreicherung nach RAPPAPORT und VASSILIADIS**

Die Anreicherung nach RAPPAPORT und VASSILIADIS bei 41 °C erwies sich als sehr effektiv, da sich die Anzahl der verdächtig erscheinenden positiven Proben nach 24-stündiger und mehr noch nach 48-stündiger Bebrütung in diesem Medium auf allen getesteten Nährbö-



den immens erhöhte; bei den meisten fand mindestens eine Verdoppelung der verdächtig erscheinenden Proben statt. Die Anzahl der unverdächtigen Proben nahm dagegen auf allen Nährböden rapide ab.

Bei den negativen Proben sank die Plattenanzahl mit verdächtig erscheinenden, falsch positiven Kolonien durchweg auf unter fünf Prozent, während der Anteil der unverdächtigen bei fast allen Nährböden bei mindestens 95 % lag. Im Schnitt zeigten über die Hälfte der Nährböden, die mit negativen Proben beimpft waren, nach Anreicherung in RV kein Bakterienwachstum.

Dies bestätigt die guten selektiven Eigenschaften dieses Mediums auch für Salmonellen und Begleitflora aus Schildkrötenkot bei der gewählten Bebrütungstemperatur von 41 °C.

Für die Identifizierung der tatsächlich positiven Kotproben hat sich die Selektivanreicherung nach RAPPAPORT und VASSILIADIS bei einer Inkubationstemperatur von 41 °C ebenfalls als vorteilhaft erwiesen, denn 59 % aller positiven Proben wurden nach Bebrütung unter diesen Bedingungen in diesem Medium entdeckt.

### **Selenit-Cystin-Selektivanreicherung**

Nach Anreicherung in S erschienen von den positiven Proben mehr verdächtig als im Direktausstrich, aber weniger als nach Anreicherung in RV. Bei den unverdächtigen, also falsch negativen ist es entsprechend: Nach Anreicherung in S erschienen weniger unverdächtige als im Direktausstrich, aber mehr als nach Anreicherung in RV. Hier bietet der Einsatz von S durchaus Vorteile gegenüber dem Direktausstrich, wenn auch dieses Medium nicht so leistungsfähig ist wie RV.

Bei den negativen Proben fällt die Beurteilung für S schlechter aus: Die meisten Nährböden zeigen nach Anreicherung des Untersuchungsmaterials in diesem Medium mehr falsch positive Proben an als beim Direktausstrich. Die Zahl der unverdächtigen Proben ist im Vergleich zum Direktausstrich nur auf wenigen Nährböden und da auch nur geringfügig angestiegen, bei einigen dagegen sogar abgesunken. Nur etwa auf 10 % aller Platten fand im Durchschnitt kein Bakterienwachstum statt.

Somit erweist sich die selektive Wirkung von S auch für Begleitflora in Schildkrötenkot als weniger effektiv als die des RV-Mediums. Die geringere Hemmwirkung von Selenitanreicherungsmedien wird schon in der Literatur beschrieben (LAPAGE & BASCOMB, 1968; HUGUES et al., 1978). Die Aussage, dass in RV die besonders störende, weil salmonellen-



ähnlich wachsende laktosenegative Begleitflora effektiver gehemmt wird als in S (VASSILIADIS et al., 1978; VASSILIADIS et al., 1979; VASSILIADIS, 1981; VASSILIADIS, 1983) kann hier ebenfalls bestätigt werden, da nach Anreicherung in S deutlich mehr verdächtige Kolonien auch auf den Laktoseindikatornährböden wuchsen als nach RV-Anreicherung; verdächtige Kolonien auf Laktoseindikatornährböden sind solche, die – genauso wie Salmonellen – Laktose nicht spalten.

Dennoch sollte man sich gut überlegen, ob man auf die Verwendung dieser Selektivanreicherung wirklich verzichten will, da sie das Wachstum von Salmonellen in Reinkultur – im Gegensatz zu RV – in keinem Fall erschwert hat. Auch konnte in dieser Untersuchung eine positive Probe nur nach Anreicherung in S und Ausstrich auf XLD erkannt werden, was in dem geringen Umfang positiver Proben immerhin einen Anteil von 5 % ausmacht.

### **Fazit**

Für die Untersuchung von Kotproben von Landschildkröten erwies sich das Anreicherungsmedium nach RAPPAPORT und VASSILIADIS bei einer Bebrütungstemperatur von 41 °C als durchaus geeignet sowohl hinsichtlich der Hemmung der Begleitflora als auch in der Förderung von Salmonellen, während die Selenitanreicherung nur wenige Vorteile bringt. Auch hier muss wiederum berücksichtigt werden, dass vor allem Schildkröten untersucht und bei ihnen nur Subspezies I und II isoliert wurden. Wie in Abschnitt 4.1.2.3 und 4.1.2.4 (S. 95) dargelegt und von einigen Autoren erwähnt (VASSILIADIS, 1968; MADSEN, 1994) wurde, sind es vor allem Subspezies IIIb-Salmonellen, die sich in RV bei 42 °C unter Umständen nicht vermehren können. Um zu vermeiden, dass viele dieser Organismen der Entdeckung entgehen, wurde in der vorliegenden Untersuchung RV nur bei 41 °C bebrütet. Dass trotzdem keinerlei Subspezies IIIb-Salmonellen isoliert werden konnten, liegt wohl hauptsächlich am untersuchten Tiermaterial, Landschildkröten, und daran, dass diese Subspezies bei Schildkröten nur sehr selten vorkommt, was auch in der Literatur beschrieben wird (IVESON et al., 1969; CAMBRE et al., 1980; GREENBERG & SECHTER, 1992). Dass sie während der ganzen Untersuchung vorkam und stets übersehen wurde, ist sehr unwahrscheinlich, da alle Proben auch direkt ausgestrichen und zwei Drittel zusätzlich in S angereichert wurden. Aus einer der beiden Echsenkotproben wurde prompt ein Serovar aus Subspezies IIIa isoliert, was dafür spricht, dass bei den untersuchten Schildkröten tatsächlich nur ein sehr enges Erregerspektrum vorlag.



Bei der Untersuchung von Echsen oder Schlangen bringt die Selenitanreicherung eventuell mehr Vorteile als bei der hier durchgeführten Schildkrötenuntersuchung, da etwa vorhandene Subspezies IIIb-Salmonellen in S möglicherweise besser nachgewiesen werden können als im Direktausstrich oder nach Anreicherung in RV. Dies sollte noch weiter untersucht werden. RV sollte auf jeden Fall stets mit eingesetzt werden, allerdings sollte eine Bebrütungstemperatur von 41 °C nicht überschritten werden.

#### 5.2.4 Salmonelleninzidenz bei den einzelnen Reptiliengruppen

Bei der Zuordnung aller in dieser Studie verwendeten bzw. isolierten Salmonellenstämme zu ihrer Subspezies und zu der Tierart, aus der sie isoliert wurden, fiel Folgendes auf:

- Die meisten hier getesteten Salmonellenisolate vom NRL-SALM und ZFF stammten von Echsen; mit Abstand die wenigsten kamen mit unter 10 % von Schildkröten. Diese Aussage relativiert sich aber unter dem Aspekt, dass nicht bekannt ist, nach welchen Gesichtspunkten die vom NRL-SALM zur Verfügung gestellten Salmonellenisolate ausgewählt wurden, und wie das Patientengut am ZFF zusammengesetzt war. Nach IVESON et al. (1969), ROGGENDORF & MÜLLER (1976), DORRESTEIN et al. (2000) und GEUE & LÖSCHNER (2002) weisen Echsen eine deutlich höhere Salmonelleninzidenz auf als die übrigen Reptilien, während CAMBRE et al. (1980) eine mittlere Salmonelleninzidenz bei Echsen und in Übereinstimmung mit GEUE & LÖSCHNER (2002) bei Schildkröten die niedrigste Salmonelleninzidenz finden.
- Die Aussage von DIMOW et al. (1961), LIE (1968), HABERMALZ & PIETZSCH (1973) und ROGGENDORF & MÜLLER (1976), dass Salmonellen der Subspezies III vor allem bei Schlangen auftreten, und bei ihnen sogar häufiger als andere Salmonellen (IVESON et al., 1969; IVESON, 1971; WUTHE et al., 1979; CAMBRE et al., 1980; FRICK, 1987; GREENBERG & SECHTER, 1992) stimmt mit hier erhaltenen Ergebnissen überein. 58 % aller in die vorliegende Studie mit einbezogenen Subspezies IIIb-Salmonellen stammen von Schlangen, aus der Subspezies IIIa sind es 30 %. Subspezies IIIa und b machen bei Schlangen zusammen 64 % aus, bei DORRESTEIN et al. (2000) sind es sogar 75 %. Dagegen kann die Behauptung von HABERMALZ &



PIETZSCH (1973) und ROGGENDORF & MÜLLER (1976), dass bei Schlangen die größte Salmonellenvariabilität gefunden werden kann, nicht bestätigt werden: In der hiesigen Studie weisen Echsen die größte Variabilität auf; Subspezies I, II, IIIa und b und IV sind bei ihnen relativ gleichmäßig vertreten, was auch DORRESTEIN et al. (2000) beschreiben. Dagegen kommt Subspezies II in der vorliegenden Untersuchung bei Schlangen nicht vor, und auch DORRESTEIN et al. (2000) weisen diese Subspezies bei Schlangen nur selten nach. Ebenso finden diese Autoren Subspezies IV relativ selten, am ehesten noch bei Echsen, bei denen diese Subspezies hier aber immerhin fast ein Drittel ausmacht; aus Schlangen wurde sie hier zu 18 % isoliert. Auch kamen in der vorliegenden Studie, ähnlich wie bei IVESON et al. (1969), CAMBRE et al. (1980) und GREENBERG & SECHTER (1992), keine Arizonakeime bei Schildkröten vor.

### **5.2.5 Salmonelleninzidenz der in dieser Studie untersuchten Schildkröten**

Betrachtet man ausschließlich die Ergebnisse der in dieser Studie vorgenommenen Untersuchung von Landschildkröten auf Salmonellen, so lässt sich auch hier eine nur geringe Salmonelleninzidenz von ca. 10 % feststellen. Ähnliche Zahlen findet man zwar in der Literatur, doch muss dabei das Probenmaterial berücksichtigt werden. (siehe Tab. 2, S. 23). Unter dem Aspekt, dass in der vorliegenden Arbeit einmalig Kot von gesunden Landschildkröten untersucht wurde, ist die hier gefundene Salmonelleninzidenz gegenüber vergleichbaren Studien mit einmaliger Kotuntersuchung von gesunden Landschildkröten mit 2 % bei DORRESTEIN et al. (2000), 3 % bei MÖRK (1997) und GEUE & LÖSCHNER (2002) und auch 7 % bei ROGGENDORF & MÜLLER (1976) sogar relativ hoch. Bei weitem reicht sie jedoch nicht an die Prozentzahlen hin, die z.B. von WEBER & PIETZSCH (1974), DIMOW et al. (1961), ANG et al. (1972), BÖVRE & SANDBU (1959) oder gar DIMOW (1966a) mit 41 bis 100 % für Landschildkröten angegeben werden (siehe Tab. 2, S. 23). Dabei ist zu beachten, dass gerade die sehr hohen Nachweisraten der letzten vier Autoren von wilden bzw. – vermutlich frisch – importierten (BÖVRE & SANDBU, 1959) Tieren gewonnen wurden. Bei diesen mag die Salmonelleninzidenz höher liegen als bei Nachzuchten oder schon lange in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten (MÖRK, 1997). DIMOW



(1966a) und ANG et al. (1972) haben außerdem eine mehrfache Kotuntersuchung durchgeführt.

### 5.2.6 Herkunft der salmonellenpositiven Schildkröten

16 von 18 Salmonellenisolaten stammten von Schildkröten aus zwei angeblich getrennten Beständen eines Besitzers; dies war eine Zoohandlung, in der naturgemäß ein höherer Tierdurchsatz besteht als in Privathaltungen oder Zuchtbetrieben. Aufgrund eben dieses vermehrten Tierdurchsatzes besteht in Zoohandlungen eine höhere Wahrscheinlichkeit für Einschleppung und Weiterverbreitung von Salmonellen; auch RUDAT et al. (1966) und GEUE & LÖSCHNER (2002) stellten eine höhere Salmonelleninzidenz in Zoohandlungen fest, während WEBER & PIETZSCH (1974) dort ein niedrigeres Salmonellenvorkommen fanden als in Privathaltungen. Neben Schildkröten werden in der besagten Zoohandlung auch Echsen und Schlangen sowie Kleinsäuger, Vögel und Fische zum Verkauf angeboten, während in keinem anderen der in diese Untersuchung einbezogenen Bestände weitere Reptilien außer den untersuchten Schildkröten gehalten wurden; für die sechs Einzeltiere liegen keine Informationen über Bestandsverhältnisse vor. Dies führt zu der Vermutung, dass eventuell Echsen oder auch Schlangen mit einer höheren Salmonelleninzidenz die Kontamination in die Zoohandlung eingeschleppt haben. Diese hat sich dann zumindest in der Schildkrötenpopulation ausgebreitet.

Für eine Ausbreitung spricht auch die Tatsache, dass unter den 16 Salmonellenisolaten von Schildkröten beider Bestände dieser Zoohandlung nur fünf verschiedene Serovare waren, während in der Literatur von der großen Variabilität der Salmonellen bei Reptilien geschrieben wird (siehe 2.1.3.3, S. 16). DORRESTEIN et al. (2000) betonen sogar die seltene Übereinstimmung von Serovaren bei Tieren eines Bestandes. In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch sogar in den beiden nach Angaben des Besitzers „strikt getrennten“ Beständen zwei gleiche Serovare nachgewiesen. Dies deutet entweder auf eine nicht ganz so strikte Trennung der beiden Bestände hin, oder auf eine extrem leichte Übertragbarkeit der Salmonellen auch zwischen Schildkröten, was von einigen Autoren bezweifelt wird (DIMOW, 1965a; PRUKSARAJ, 1967; HABERMALZ & PIETZSCH, 1973; WUTHE et al., 1979). Dass Salmonellen von Schildkröten – und von Reptilien allgemein – leicht und auch durch



indirekten Kontakt auf den Menschen und auf Säugetiere übertragen werden können, wurde im Schrifttum schon ausführlich dargestellt (siehe 2.1.5.3, S. 41).

Sehr auffällig ist, dass in Terrarium T9 in Bestand B10 alle Schildkröten salmonellenpositiv sind und sogar das gleiche Serovar ausscheiden, und auch der Hardun, der ebenfalls in diesem Terrarium gehalten wird, das gleiche Serovar beherbergt. Das kann kein Zufall sein, sondern muss durch Übertragung von einem Tier auf das andere erfolgt sein. Ob nun aber eine der Schildkröten aus diesem Terrarium oder die Echse die ursprüngliche Quelle waren, oder eine andere Schildkröte – zumindest bei einer Spinnenschildkröte aus B10/T3 wurde ebenfalls das gleiche Serovar nachgewiesen – oder auch das Futter – es wurden Gras und verschiedene Kräuter von einer bestimmten Wiese gesammelt – ist ungewiss; vermutlich stammt die Kontamination von der Echse. Immerhin konnten aus beiden untersuchten Echsenkotproben, der Einzelprobe von dem Hardun und der Sammelprobe von den Schildkröten, Salmonellen isoliert werden. Derzeit laufen Pulsfeldgelelektrophorese-Untersuchungen (PFGE), die beweisen sollen, ob die gefundenen Serovare zufällig die gleichen sind, oder ob es sich tatsächlich um einen „Klon“ handelt, der durch Übertragung im Bestand weiterverbreitet wurde.

In ihrer Studie fand MÖRK (1997) bei zwei Schildkröten von verschiedenen Besitzern, die mit Sicherheit keinen Kontakt zueinander hatten, ebenfalls zweimal das gleiche Serovar.

Eine aussagekräftige Analyse, ob nun tatsächlich mehr Wildfänge salmonellenpositiv sind als Nachzuchten, wie die Ergebnisse von DIMOW et al. (1961), DIMOW (1966a) und ANG et al. (1972) annehmen lassen, kann anhand der hier gewonnenen Daten nicht erhoben werden, da zu wenige salmonellenpositive Schildkröten identifiziert wurden. Zwar ergibt sich bei Betrachtung der Ergebnisse ein Verhältnis von etwa 1,5:1 salmonellenpositiver Wildfänge zu salmonellenpositiven Nachzuchten (siehe Tab. 10, S. 82), da aber die meisten Salmonellenträger aus den zwei Beständen der Zoohandlung kamen und hier eventuell doch eher eine gegenseitige Übertragung als eine natürliche Kontamination vorliegt, darf diese Aussage nicht zu stark bewertet werden.

Wahrscheinlich hätte man bei mehrmaliger Untersuchung der Schildkröten in diesen beiden Beständen noch weitere Salmonellen ausscheidende Tiere entdeckt. Die nachgewiesene Salmonelleninzidenz liegt hier bei 47 %. Vermutlich wären auch mehr Salmonellen isoliert worden, wenn bei der einmaligen Probennahme mehrere morphologisch gleichartige Kolonien von einer Nährbodenplatte differenziert worden wären; dies war aber aus Kostengründen nicht möglich. Mit Sicherheit wären in diesem Fall aber Mehrfachinfektionen festgestellt



worden, die aufgrund der beschriebenen Isolierungs- und Nachweismethoden nicht nachgewiesen werden konnten. GEUE& LÖSCHNER (2002) berichten, dass in salmonellenpositiven Reptilienbeständen die Inzidenz sehr hoch ist, z.T. liegt sie sogar bei 100 %.

Ob in den übrigen Beständen bei mehrmaliger Untersuchung salmonellenpositive Tiere entlarvt worden wären, erscheint fraglich, denn die Wahrscheinlichkeit, dass von einer salmonellenpositiven Population zum Zeitpunkt der Probennahme zufällig gerade kein einziges Tier diese Bakterien ausscheidet, ist sehr gering.

### 5.3 RESÜMEE

In der vorliegenden Studie wurden 167 Landschildkröten verschiedener Arten aus 10 Beständen in und um München auf Salmonellen untersucht. Bei einer einmaligen Kotuntersuchung erwiesen sich 10 % der Schildkröten als Salmonellenträger.

Die Wahrscheinlichkeit des Nachweises steigt mit dem betriebenen Aufwand, z.B. ob aus einer Anreicherung nach 24 und 48 Stunden ausgestrichen wird oder nur einmal, wie viele Selektivanreicherungsmedien und Differenzierungsnährböden eingesetzt und wie viele Kulturen weiterdifferenziert werden.

Wenn man aber wissen möchte, ob Salmonellen in den Proben vorhanden sind oder nicht, dann erscheint der Aufwand gerechtfertigt, und es sollte auch alles darangesetzt werden, dass man etwa vorhandene Salmonellen findet.

Für die Untersuchung von Landschildkröten auf Salmonellen würde sich folgende Methode anbieten:

- Direktausstrich der Proben auf BPLS und XLD
- Anreicherung der Kotproben in RV und Selenit-Cystin-Selektivanreicherung
- Bebrütung von RV bei 41 °C, von S bei 37 °C
- Ausstrich aus den Anreicherungsmedien nach 24 und 48 Stunden auf BPLS und XLD

Dieses Verfahren hat sich in der vorliegenden Untersuchung für die Isolation und Identifikation von Salmonellen von Landschildkröten bewährt. Allerdings muss daran erinnert werden, dass aus den Schildkröten nur laktosenegative Subspezies I und II-Salmonellen isoliert werden konnten. Aus der einen Echsenkotprobe konnte ein ebenfalls laktosenegatives Serovar aus



der Subspezies IIIa isoliert werden. Der Nachweis von Salmonellen bei Echsen und Schlangen bringt vermutlich mehr Schwierigkeiten mit sich, da hier vermehrt mit Salmonellen aus Subspezies IIIa und b und IV gerechnet werden muss, bei denen biochemische Reaktionen oftmals uncharakteristisch für Salmonellen ausfallen und deshalb häufiger salmonellen-untypische Kolonien auf Differenzierungsnährböden entstehen. Unter Umständen wäre hier der MLCB-Agar hilfreich, dies sollte in weitergehenden Studien untersucht werden.

Der Nachweis von Mehrfachinfektionen ist eigentlich nur von wissenschaftlichem Interesse; für den Besitzer ist es wesentlich zu wissen, ob sein Tier Salmonellen ausscheidet oder nicht. Dabei ist auch ein mehrmals negatives Ergebnis niemals hundertprozentig sicher, ein gewisses Restrisiko bleibt immer bestehen; deshalb sollten Hygiene und Vorsicht in der Haltung und Pflege von Reptilien in jedem Falle weiterhin empfohlen werden.



## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine geeignete Methode für den Nachweis von Salmonellen bei Landschildkröten gefunden werden.

Vorab wurde ein Überblick über das Vorkommen von Salmonellen bei Reptilien und die Bedeutung dieser Mikroorganismen sowohl für die Reptilien selbst als auch für den Menschen gegeben.

In der Untersuchung wurde eine für die Vermehrung von Reptiliensalmonellen in der Selektivanreicherung geeignete Inkubationstemperatur ermittelt. Im Weiteren wurden 86 Salmonellenstämme, die aus Reptilien isoliert worden waren, auf neun verschiedenen Salmonellen-Selektiv- und Differenzierungsnährböden auf ihre Koloniemorphologie hin geprüft; diese waren der BPLS-, DCLS-, HE-, MLCB-, ÖNÖZ-, RAMBACH-, SS-, WS- und XLD-Agar. Die Nährböden wurden nach ihrer Eignung für die Identifikation dieser Salmonellenstämme beurteilt.

Schließlich wurden in einer Feldstudie 167 Kotproben von Landschildkröten verschiedener Arten und zwei Echsen im Münchner Raum nach der vorher ermittelten Methode auf das Vorhandensein von Salmonellen untersucht. Damit sollte die Eignung der Methode überprüft und die Salmonelleninzidenz unter diesen Landschildkröten festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren:

Die schnellste Vermehrung von Reptiliensalmonellen erfolgte bei einer Inkubationstemperatur von 35 und 37 °C in der Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS und der Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon. Die obere kritische Temperatur für die Bebrütung der Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS liegt bei 42 °C; vor allem Salmonellen aus Subspezies IIIb können sich bei dieser Temperatur in diesem Medium oft nicht vermehren. Um ungehindertes Salmonellenwachstum bei größtmöglicher Hemmung der Begleitflora zu erzielen, wird deshalb eine Inkubationstemperatur von 41 °C für das Selektivanreicherungsmedium nach RAPPAPORT und VASSILIADIS vorgeschlagen. Die Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon hatte bei keiner der



untersuchten Temperaturen einen negativen Effekt auf das Wachstum von Salmonellen, wirkte jedoch auch auf die Begleitflora weniger hemmend. Die Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT unterstützt das Wachstum von Reptiliensalmonellen am wenigsten.

Für die Isolation von Salmonellen aus Landschildkröten erwiesen sich – sowohl im Direktausstrich als auch nach vorheriger Selektivanreicherung – besonders der BPLS- und der XLD-Agar als geeignet. Für den Nachweis von Salmonellen bei Schlangen und Echsen sollte unbedingt der MLCB- oder auch der WS-Agar mitgeführt werden.

Um eine möglichst sichere Aussage zu erlangen, sollten sowohl für den Direktausstrich als auch nach Anreicherung mindestens zwei verschiedene Differenzierungsnährböden verwendet werden. Die RAPPAPORT-VASSILIADIS- und Selenit-Cystin-Anreicherungs-bouillon sollten parallel eingesetzt und zu mindestens zwei verschiedenen Bebrütungszeiten auf feste Nährmedien überimpft werden. Aufgrund der intermittierenden Ausscheidung sollten mehrere Kotproben untersucht werden. Je größer der Aufwand ist, umso höher wird auch die Nachweisrate sein. Dennoch ist ein negatives Ergebnis niemals 100 % sicher.

Die Salmonelleninzidenz unter den hier untersuchten Landschildkröten liegt bei einmaliger Probennahme bei ca. 10 %. Zwei der 18 salmonellenpositiven Schildkröten stammten aus verschiedenen Privathaltungen, die übrigen 16 aus zwei getrennten Beständen einer Zoohaltung.

Eine Aussage über eine höhere Inzidenz bei Nachzuchttieren oder Wildfängen war aufgrund dieser Tatsache nur bedingt möglich.



## 7. SUMMARY

### EVIDENCE OF *SALMONELLA* SPP. IN TORTOISES

In the present study an efficient procedure for detecting salmonellas in feces of tortoises should be established.

First of all a survey of occurrence of salmonellas in reptiles and their importance for reptiles as well as for man is given.

Next an appropriate incubation temperature for multiplying salmonellas of reptilian origin in a selective enrichment medium was evaluated.

Furthermore 86 *salmonella* strains isolated from reptiles were tested on nine different selective solid media for their appearance; these media were BPLS-, DCLS-, HE-, MLCB-, ÖNÖZ-, RAMBACH-, SS-, WS- and XLD-Agar. The media were reviewed according to their qualification in identifying those strains.

Finally 167 fecal samples of tortoises of different species and two lizards from Munich area were examined according to the former established procedure whether or not they harboured salmonellas. Therewith the suitability of this method should be determined and the incidence of salmonellas of these tortoises should be investigated.

Following results were obtained:

The best growth of salmonellas resulted from RAPPAPORT-VASSILIADIS and selenite cystine enrichment broth at an incubation temperature of 35-37 °C.

The higher critical temperature for incubation of RAPPAPORT-VASSILIADIS enrichment medium is 42 °C; especially *Salmonella* subspecies IIIb often are inhibited in this medium at this temperature. For isolating salmonellae as well as for inhibiting competing organisms, an incubation temperature of 41 °C is emphasized for enrichment in RAPPAPORT-VASSILIADIS broth.



Neither temperature investigated had any inhibitory effect on the growth rate of salmonellas in selenite cystine medium, but its inhibitory activity on competing organisms proved strikingly less, too.

RAPPAPORT's enrichment medium supports growing of salmonellas of reptilian origin least of all.

For isolation of salmonellas from tortoises BPLS- and XLD-agar proved best for direct striking as well as after previous enrichment in either RAPPAPORT-VASSILIADIS or selenite cystine medium or both. For investigation of snakes and lizards MLCB- or eventually WS-agar should be used.

For achieving a most reliable statement at least two different agar media should be used for direct plating as well as for enrichment subculture. RAPPAPORT-VASSILIADIS and selenite cystine enrichment medium should be used simultaneously and spread on at least twice at different times of incubation. On account of the intermittent excretion of salmonellas several fecal samples should be examined. The more extended the effort the better the results will be. Though a single negative result never is absolutely reliable.

In this study the incidence of salmonellas in tortoises – investigating only a single sample from each animal – ranks at about 10 %. Two out of 18 tortoises positive for salmonellas originated from different private owners; the remaining 16 belonged to two stocks of a pet shop. Therefore statements about higher incidence of wild cut or home bred tortoises were not practicable.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- ACKMAN, D.M., P. DRABIN, G. BIRKHEAD, & P. CIESLAK (1995): Reptile-associated salmonellosis in New York State. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**, 955-959
- ALTMANN, D. & I. ALTMANN (1977): Haltung, Ernährung und Erkrankungen von Landschildkröten im Thüringer Zoopark Erfurt. *Ver.ber. Erkr. d. Zootiere* **19**, 69-79
- ALTMANN, R., J.C. GORMAN, L.L. BERNHARDT & M. GOLDFIELD (1972): Turtle-associated Salmonellosis. II. The relationship of pet turtles to salmonellosis in children in New Jersey. *Am. J. Epidemiol.* **95**, 518-520
- ANG, Ö., Ö. ÖZEK, E.T. CETIN & K. TÖRECI, K (1973): Salmonella serotypes isolated from tortoises and frogs in Istanbul. *J. Hyg.* **71**, 85-88
- ANONYMUS (1975): FDA bans commercial sale of baby turtles and eggs. *J. Am. Med. Ass.* **167**, 202-203
- ANONYMUS (1981): Reptilian salmonellosis. *The Lancet* **2**, 130-131
- ANONYMUS (1992a): Iguana-associated salmonellosis – Indiana, 1990. *Morb. Mort. Week. Report* **41**, 38-39
- ANONYMUS (1992b): Lizard-associated salmonellosis – Utah. *Morb. Mort. Week. Report* **41**, 610-611
- ANONYMUS (1999): Reptile-associated salmonellosis – Selected States, 1996-1998. *Morb. Mort. Week. Report* **48**, 1009-1013
- ANONYMUS (2000a): Leguan im Haus kann Tod bringen. *Die Rheinpfalz* v.15.06.2000
- ANONYMUS (2000b): Reptilien als Haustiere: Gefahr der Salmonella-Infektion. *Robert Koch-Institut. Epidemiol. Bulletin* **21**, 169
- BAKER, E.F., H.W. ANDERSON & J. ALLARD (1972): Epidemiological aspects of turtle-associated salmonellosis. *Arch. Environ. Health* **24**, 1-9
- BÄNFFER, J.F.J. (1971): Comparison of the isolation of salmonellae from human faeces by enrichment at 37 °C and at 43 °C. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **217**, 35-40
- BANWART, G.J. & J.C. AYRES (1953): Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* **1**, 296-301
- BLACKBURN, B.O. & E.M. ELLIS (1973): Lactose-fermenting *Salmonella* from dried milk and milk-drying plants. *Appl. Microbiol.* **26**, 672-674



- BLASER, M.J. & L.S. NEWMAN (1982): A review of human salmonellosis: I. Infective Dose. Rev. Infect. Dis. **4**, 1096-1105
- BLOBEL, H. & T. SCHLIESSER (1981): Salmonella, in: BLOBEL, H. & T. SCHLIESSER (Hrsg.): Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band 3, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 344-451
- BOAM, G.W., V.L. SANGER, D.F. COWAN & D.P. VAUGHAM (1970): The pathogenicity for mice of two species of *Samonella* isolated from the green iguana (*Iguana iguana*). J. Am. Vet. Med. Ass. **157**, 689-690
- BOAM, G.W., V.L. SANGER, D.F. COWAN & D.P. VAUGHAM (1970): Subcutaneous abscesses in iguanid lizards. J. Am. Vet. Med. Ass. **157**, 617-619
- BOCKEMÜHL, J (1992): Enterobacteriaceae, in: BURCKHARDT, F. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme-Verlag Stuttgart-New York, 138-141
- BÖVRE, K. & P. SANDBU (1959): Salmonella excreting tortoises in Oslo. Acta Pathol. Scand. **46**, 339-342
- BOYCOTT, J.A., J. TAYLOR & S.H. DOUGLAS (1953): Salmonella in tortoises. J. Pathol. Bacteriol. **65**, 401-411
- BREDE, H.D. (1963): Salmonella calvinia: 6,7:a:z<sub>42</sub>, eine neue Salmonella-Species. Zbl. Bakt. 1. Orig. **188**, 137-138
- BRENNER, F.W., R.G. VILLAR, F.J. ANGULO, R. TAUXE & B. SWAMINATHAN (2000): *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. **38**, 2465-2467
- BURCKHARDT, F (1992): Färbeverfahren, in BURCKHARDT, F. (Hrsg.): Mikrobiologische Diagnostik Georg Thieme-Verlag Stuttgart-New York, 680-693
- BURNHAM, B.R., D.H. ATCHLEY, R.P. DE FUSCO, K.E. FERRIS, J.C. ZICARELLI, H.H. LEE & F.J. ANGULO (1998): Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* organisms among captive green iguanas and potential public health implications. J. Am. Vet. Med. Ass. **213**, 48-50
- CALDWELL, M.E. & D.L. RYERSON (1939): Salmonellosis in certain reptiles. J. Infect. Dis. **65**, 241-245
- CAMBRE, R.C., D.E. GREEN, E.E. SMITH, R.J. MONTALI & M. BUSH (1980): Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. J. Am. Vet. Med. Ass. **177**, 800-803
- CARLSON V.L., G.H. SNOEYENBOS, B.A. MCKIE & C.F. SMYSER (1967): A comparison of incubation time and temperature for the isolation of Salmonella. Avian Dis. **11**, 217-225
- CARLSON, V.L. & G.H. SNOEYENBOS (1972): Relationship of population kinetics of *Salmonella* Typhimurium and cultural methodology. Am. J. Vet. Res. **33**, 177-184
- CARLSON, V.L. & G.H. SNOEYENBOS (1974): Comparative efficacies of selenite and tetrathionate enrichment broths for the isolation of *Salmonella* serotypes. Am. J. Vet. Res. **35**, 711-718



- CHATTOPADHYAY, B. & J.N. PILFOLD (1976): The effect of prolonged incubation of selenite F broth on the rate of isolation of *Salmonella* from faeces. *Med. Lab. Sc.* **33**, 191-194
- CHIODINI, R.J. & J.P. SUNDBERG (1981): Salmonellosis in reptiles: A review. *Am. J. Epidemiol.* **113**, 494-499
- CHIODINI, R.J. (1982): Transovarian passage, visceral distribution, and pathogenicity of *Salmonella* in snakes. *Infection and Immunity* **36**, 710-713
- CLEGG, F.C. & P.J. HEATH (1975): Salmonella excretion by terrapins and the associated hazard to human health. *Vet. Rec.* **96**, 90-91
- COHEN, M.L., M. POTTER, R. POLLARD & R.A. FELDMAN (1980): Turtle-associated salmonellosis in the United States. Effect of public health action, 1970-1976. *J. Am. Med. Ass.* **243**, 1247-1249
- COLLARD, P. & M. UNWIN (1958): A trial of RAPPAPORT's medium. *J. Clin. Pathol.* **11**, 426
- COOPER, J.E. & M.P.C. LAWTON (1977): Einführung, in: BEYNON, P.M., P.M.C. LAWTON & J.E. COOPER (Hrsg.): *Kompendium der Reptilienkrankheiten*. Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH und Co., 14-19
- COWAN, D.F. (1968): Diseases of captive reptiles. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **153**, 848-859
- D'AOUST, J.-Y., E. DALEY, M. CROZIER & A.M. SEWELL (1990): Pet turtles: A continuing international threat to public health. *Am. J. Epidemiol.* **132**, 233-238
- DALTON, C., R. HOFFMAN & J. PAPE (1995): Iguana-associated salmonellosis in children. *Ped. Infect. Dis. J.* **14**, 319-320
- DE HAMEL, F.A. & H.M. MCINNES (1971): Lizards as vectors of human salmonellosis. *J. Hyg.* **69**, 247-253
- DESSI, S., C. SANNA & L. PAGHI (1992): Human salmonellosis transmitted by a domestic turtle. *Europ. J. Epidemiol.* **8**, 120-121
- DIN 58942-5 (1995): Kulturmedien für die Bakteriologie. Teil 5: Anforderungen und Auswahl von Kulturmedien für die Stuhl Diagnostik. Beuth Verlag GmbH, 1-4 und Beiblatt 1, 1-3
- DIMOW, I. (1965a) Über die Dauer der fäkalen Salmonellenausscheidung bei den Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. *Z. Hyg.* **151**, 326-330
- DIMOW, I. (1965b): Über die Zeitdauer der fäkalen Arizona-Ausscheidung bei den Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. *Z. Hyg.* **151**, 105-106
- DIMOW, I. (1966a): Die Verbreitung der fäkalen Salmonella- und Arizona-Dauerausscheidung bei den freilebenden *Schildkröten Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. *Z. med. Mikrobiol. Immunol.* **152**, 198-203
- DIMOW, I. (1966b): Über den Charakter der fäkalen Arizona-Dauerausscheidungen bei den Landschildkröten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. *Z. med. Mikrobiol. Immunol.* **152**, 204-210



- DIMOW, I. (1966c): Versuche, Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni* mit Salmonellabakterien zu infizieren. Zbl. Bakteriolog. Hyg., I. Abt. Orig. **199**, 181-184
- DIMOW, I. (1966d): Versuche zur künstlichen Infektion von Eidechsen (*Lacerta muralis*) mit Salmonella- und Arizonabakterien. Zbl. Vet.-Med. B **13**, 587-590
- DIMOW, I. (1968) Die epidemiologische Bedeutung der Ausscheidung von Salmonellabakterien bei Reptilien. Zbl. Bakteriolog. I. Abt. Ref. **214**, 335-342
- DIMOW, I. & R. ROHDE (1965): Die Verbreitung der Arizona-Bakterien unter den freilebenden Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. Z. Hyg. **151**, 107-110
- DIMOW, I. & R. SLAWTSCHEW (1967): Versuche der Experimentalinfizierung von Schlangen *Vipera ammodytes ammodytes* mit Salmonella- und Arizonabakterien. Pathol. Microbiol. **30**, 495-497
- DIMOW, I., W. WESSELINOFF & R. ROHDE (1961): Salmonellabefall von Landschildkröten (*Testudo graeca*) in Bulgarien. Z. Hyg. **148**, 135- 141
- DORRESTEIN, G. M., M.N. BUITELAAR, M. KIK, M. VAN DER HAGE & W.J. VAN LEEUWEN (2000) *Salmonella* spp. in reptiles: An evaluation of isolates over the period 1971-1998. Eur. Ass. Zoo Wildlife Veterinarians, Proceedings of the 3. scientific meeting, 2000, Paris, France
- DU PONTE, M.W., R.M. NAKAMURA & E.M.L. CHANG (1978): Activation of latent *Salmonella* and *Arizona* organisms by dehydration in red-eared turtles, *Pseudemys scripta elegans*. Am. J. Vet. Res. **39**, 529-530
- DUSCH, H. & M. ALTWEGG (1995): Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. J. Clin. Microbiol. **33**, 802-804
- EDEL, W. & E.H. KAMPELMACHER (1969): *Salmonella* isolation in nine European laboratories using a standardized technique. Bull. Wld. Hlth. Org. **41**, 297-306
- EDWARDS, P.R., M.A. FIFE & C.H. RAMSEY (1959): Studies on the Arizona group of Enterobacteriaceae. Bacteriol. Rev. **23**, 155-174
- ELZE, K., A. BERGMANN, K. EULENBERGER, H.-J. SELBITZ & W.-E. ENGELMANN (1977): Auswertung des Krankheitsgeschehens bei Reptilien im Zoologischen Garten Leipzig (1957-1976). Ver.ber. Erkr. Zootiere **19**, 45-55
- EUZÉBY, J.P. (2002): List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>
- FRANK, W. & B. LOOS-FRANK (1977): Interessante Krankheitsbilder bei Amphibien und Reptilien, die durch Bakterien, Pilze und Parasiten bedingt sind – eine Übersicht nach 15jähriger Erfahrung. Ver.ber. Erkr. Zootiere **19**, 31-55
- FREYDIERE, A.-M. & Y. GILLE (1991): Detection of salmonellae by using Rambach agar and by a C8 esterase spot test. J. Clin. Microbiol. **29**, 2357-2359
- FRICK, M. (1987): Salmonellen in freilebenden Streifenringelnattern Anatoliens (*Natrix natrix persa* [Pallas]), zugleich ein Beitrag zur Epidemiologie und Pathogenität von Salmonellen des Subgenus III. Diss. Med. Aalen



- FUJITA, K., K. MURONO & H. YOSHIOKA (1981): Pet linked salmonellosis. *The Lancet* **2**, 525
- GABRISCH, K & P. ZWART (1998): Schildkröten, in: GABRISCH, K & P. ZWART (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere, Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, 636-750
- GEBAUER, B. (1954) Feststellung eines seltenen Salmonellatyps (*Salmonella canastel*) bei einer Schildkröte. *Zbl. Bakteriol. 1. Abt. Orig.* **161**, 239-240
- GEORGALA, D.L. & M. BOOTHROYD (1965): A System for detecting salmonellae in meat and meat products. *J. Appl. Bacteriol.* **28**, 206-212
- GEUE, L. & U. LÖSCHNER (2002): *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet. Microbiol.* **84**, 79-91
- GILJAHN, L.K & T.J. HALPIN (1988): Turtle-associated salmonellosis – Ohio. *Morb. Mort. Week. Rep.* **35**, 733-738
- GÖBEL, T. & B.J. SCHILDGER (1990): Bakterielle Infektionen bei Reptilien. *Ver.ber. Erkr. Zootiere* **32**, 205-210
- GOO, V.Y.L., G.Q.L. CHING & J.M. GOOCH (1973): Comparison of brilliant green agar and hektoen enteric agar in the isolation of salmonellae from food products. *Appl. Microbiol.* **26**, 288-292
- GREENBERG, Z. & I. SECHTER (1992): *Salmonella* serotypes isolated from snakes and other reptiles – Israel, 1953-1989. *Isr. J. Vet. Med.* **47**, 49-60
- GRUENEWALD, R., R.W. HENDERSON & S. YAPPOW (1991): Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2354-2356
- GUINÉE, P.A.M., E.H. KAMPELMACHER & H.H.M. HOEJENBOS-SPITHOUT (1965): Further studies on the influence of variations in the enrichment method for the detection of salmonellae. *Antonie van Leeuwenhoek* **31**, 1- 10
- HABERMALZ, D. & O. PIETZSCH (1973): Der Nachweis von Arizona-Bakterien, zugleich ein Beitrag zum Problem der *Salmonella*-Infektionen bei Reptilien und Amphibien in Zoologischen Gärten. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **225**, 323-342
- HALLMANN, L. & F. BURKHARDT (1974): Familie: Enterobacteriaceae, in: HALLMANN, L. & F. BURKHARDT (Hrsg.): *Klinische Mikrobiologie*. 4. Neubearb. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 92-134
- HARVEY, R.W.S. (1956): Choice of a selective medium for the routine isolation of members of the *Salmonella* group. *Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.* **15**, 118-124
- HARVEY, R.W.S. & T.H. PRICE (1964): The isolation of *Salmonella Typhi* from selenite enrichment media. *Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.* **23**, 233-235
- HARVEY, R.W.S. & T.H. PRICE (1968): Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of salmonellas from heavily contaminated materials. *J. Hyg.* **66**, 377-381
- HARVEY, R.W.S. & T.H. PRICE (1976): Isolation of salmonellas from sewage-polluted river water using selenite F and Muller-Kauffmann tetrathionate. *J. Hyg.* **77**, 333-339



- HARVEY, R.W.S. & T.H. PRICE (1979): Principles of Salmonella Isolation. J. Appl. Bacteriol. **46**, 27-56
- HARVEY, R.W.S & T.H. PRICE (1980): Salmonella isolation with Rappaport's medium after pre-enrichment in buffered peptone water using a series of inoculum ratios. J. Hyg. **85**, 125-128
- HARVEY, R.W.S. & T.H. PRICE (1983): Salmonella isolation from reptilian faeces: A discussion of appropriate cultural techniques. J. Hyg. Camb. **91**, 25-32
- HARVEY, R.W.S., T.H. PRICE & P.B. CRONE (1975): Quality control tests of two Salmonella enrichment media using different inocula. J. Hyg. **74**, 375-38
- HARVEY, R.W.S., T.H. PRICE & E. XIROUCHAKI (1979): Comparison of selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for the isolation of salmonellas from sewage-polluted natural water using a pre-enrichment technique. J. Hyg. **83**, 451-459
- HARVEY, R.W.S. & S. THOMSON (1953): Optimum temperature of incubation for isolation of salmonellae. Mon. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv. **12**, 149-150
- HEINZERLING, F.K. (1995): Das Vorkommen von Salmonellen der Subspecies II-VI einschließlich *S. bongori* in Deutschland, 1977-1992. Diss. Med. Hamburg
- HINSHAW, W.R. & E. MCNEIL (1944): Gopher snakes as carriers of salmonellosis and paracolon infections. Cornell Vet. **34**, 248-254
- HOBBS, B.C. & V.D. ALLISON (1945): Studies on the isolation of *Bact. typhosum* and *Bact. paratyphosum* B. I. Comparison of the selective value of Wilson Blair (Difco) and desoxycholat-citrate agars and four liquid enrichment media including selenite F. Month. Bull. Min. Health Pub. Health Lab. Serv. **4**, 12-19
- HOBEN, D.A, D.H. ASHTON & A.C. PETERSON (1973): Some observations on the incorporation of Novobiocin into Hektoen enteric agar for improved *Salmonella* isolation. Appl. Microbiol. **26**, 126-127
- HOOPER, W.L. & H.R. JENKINS (1965): An evaluation of Rappaport's magnesium chloride/malachite green medium in the routine examination of faeces. J. Hyg. **63**, 491-495
- HRÚZIK, J. (1983): Salmonella-Infektionen, in: BRÜSCKE, H. (Hrsg.): Handbuch der inneren Erkrankungen. Band 5 Infektionskrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 607-615
- HUGHES, M.H., D.I. BARTLETT, M. BAKER, R.E. DREAPER & E.B. ROWE (1971): Gastroenteritis due to *Salmonella* subgenus III (Arizona). A second case diagnosed in Britain. J. Hyg. **69**, 507-509
- HUGUES, B., M. PLISSIER, A. PAGLIARDINI, J.L. PLANTAT & J. GAISSA (1978): Experimental study on the growth of *Salmonella* and Coli-aerogenes Bacteria in pure and mixed cultures, in a fermentor, in two different enrichment media: Sodium selenite and tetrathionate broth. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **5**, 133-141
- IPPEN, R. & H.-D. SCHRÖDER (1977): Zu den Erkrankungen der Reptilien. Ver.ber. Erkr. Zootiere **19**, 15-29



- IPPEN, R. (1968): Die Erkrankungen des Respirationsapparates der Reptilien. Ver.ber. Erkr. Zootiere **10**, 37-43
- IVESON, J.B. (1971): Strontium chloride B and E. E. enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and *Arizona* species from tiger snakes. J. Hyg. **69**, 323-330
- IVESON, J.B. (1973): Enrichment procedures for the isolation of *Salmonella*, *Arizona*, *Edwardsiella* and *Shigella* from faeces. J. Hyg. **71**, 349-361
- IVESON, J.B., E.M. MACKAY-SCOLLAY (1969): Strontium chloride and strontium selenite enrichment broth media in the isolation of *Salmonella*. J. Hyg. **67**, 457-464 #
- IVESON, J.B., E.M. MACKAY-SCOLLAY (1972): An evaluation of strontium chloride, Rappaport and strontium selenite enrichment for the isolation of salmonellas from man, animals, meat products and abattoirs effluents. J. Hyg. **70**, 367-384
- IVESON, J.B., E.M. MACKAY-SCOLLAY & V. BAMFORD (1969): *Salmonella* and *Arizona* in reptiles and man in Western Australia. J. Hyg. **67**, 135-145
- JACKSON C.G. & M.M. JACKSON (1971): The frequency of *Salmonella* and *Arizona* microorganisms in zoo turtles. J. Wildlife Dis. **7**, 130-132
- JAFARI, M., J. FORSBERG, R.O. GILCHER, J.W. SMITH, J.M. CRUTCHER, M. MCDERMOTT, B.R. BROWN & J.N. GEORGE (2002): *Salmonella* sepsis caused by a platelet Transfusion from a donor with a pet snake. New England J. Med. **347**, 1075-1078
- JAMESON, J.E. (1962): A discussion of the dynamics of salmonella enrichment. J. Hyg. **60**, 193-197
- JAMESON, J.E. (1963): A note on the isolation of salmonellae. J. Appl. Bacteriol. **26**, 112-114
- JEFFRIES, L. (1959): Novobiocin-tetrathionate broth: A medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae from faeces. J. Clin. Pathol. **12**, 568-571
- JEPHCOTT, A.E., D.R. MARTIN & R. STALKER (1969): *Salmonella* excretion by pet terrapins. J. Hyg. **67**, 505-510
- JONES, P.W., P. COLLINS & A.J. HAYLE (1984): The effect of sodium sulphacetamide and sodium mandelate in brilliant green agar on the growth of salmonellas. J. Appl. Bacteriol. **57**, 423-428
- KALVIG, B.A., L. MAGGIO-PRICE, J.TSUJI & W.E. GIDDENS (1991): Salmonellosis in laboratory-housed iguanid lizards (*Sceloporus* spp.). J. Wildlife Dis. **27**, 551-556
- KAMPELMACHER, E.H., P.A.M. GUINÉE, M.A. FIFE & P.R. EDWARDS (1962): Eight new *Arizona* serotypes isolated from reptiles. Antonie van Leeuwenhoek **28**, 399-40
- KAUFFMANN, F. (1935): Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. Z. Hyg. Infekt.krkh. **117**, 26-32
- KAUFFMANN, F. (1964): Das Kauffmann-White Schema., in: Van Oye, E. (ed.): The world problem of salmonellosis. Dr. W. Junk, Den Hag, Zuid-Nederlandsche Drukkerij N. V. 's-Hertogenbosch, 21-41
- KAUFMANN, A.F. (1966): Pets and *Salmonella* infection. J. Am. Vet. Med. Ass. **149**, 1655-1661



- KAUFMANN, A.F. & Z.L.MORRISON (1966): An epidemiologic study of salmonellosis in turtles. *Am. J. Epidemiol.* **84**, 364-370
- KAUFMANN, A.F., M.D. FOX, G.K. MORRIS, B.T. WOOD, J.C. FEELY & M.K. FRIX (1972) Turtle associated salmonellosis. III. The effects of environmental *Salmonellae* in commercial turtle breeding ponds. *Am. J. Epidemiol.* **95**, 521-528
- KELLY, J., R. HOPKIN & M.E. RIMSZA (1995): Rattlesnake meat ingestion and *Salmonella arizona* infection in children: Case report and review of the literature. *Ped. Infect. Dis. J.* **14**, 320-322
- KELTERBORN, E. (1979): Über die Häufigkeit des Vorkommens der *Salmonella*-Spezies. Eine Untersuchung an 1,5 Millionen *Salmonella*-Kulturen, die von 1934 bis 1975 in 109 Ländern isoliert worden waren. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **243**, 289
- KIESEWALTER, J., K.-D. RUDAT & G. SEIDEL (1960): *Salmonellen* aus Reptilien. *Zbl. Bakteriol. I. Abt. Orig.* **180**, 503-509
- KING, S. & W.I. METZGER (1968): A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. *Appl. Microbiol.* **16**, 577-578
- KIST, M., J. BOCKEMÜHL, S. ALEKSIC, M. ALTWEGG, I.B. AUTENRIETH, W. BÄR, L. BEUTIN, B. GERTEN, E. HEINTSCHEL VON HEINEGG, H. KARCH, A. LEHMACHER, F. MEHNERT, U. SONNENBORN, T. TSCHÄPE, C.VON EICHEL-STREIBER (2000): MIQ 9: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. *Infektionen des Darmes.* Urban & Fischer Verlag München-Jena, 32-40
- KNOX, R., P.G.H. GELL & M.R. POLLOCK (1943): The selective action of tetrathionate in bacteriological media. *J. Hygiene* **43**, 147-159
- KOOPMAN, J.P. & F.G.J. JANSSEN (1973): The occurrence of salmonellas and lactose-negative arizonas in reptiles in the Netherlands, and a comparison of three enrichment methods used in their isolations. *J. Hyg.* **71**, 363-371
- KÖSTERS, J. (1993): Enterobacteriaceae, in: SIEGMANN, O. (Hrsg.): *Kompendium der Geflügelkrankheiten.* Verlag Paul Parey, 5. Aufl., 194-200
- KÜHN, H. (1995): 2. Vorkommen und epidemische Verbreitung, in: KÜHN, H. & H. TSCHÄPE (Hrsg.): *Salmonellosen des Menschen. Epidemiologische und ätiologische Aspekte.* RKI-Schriften 3/95, Medizin Verlag München, 19-35
- KULKA, D., H.-J. LUDWIG & H. HELBING (1994): *Salmonella* Enteritidis-Infektion im Thüringer Zoopark Erfurt. *Ver.ber. Erkr. Zootiere* **36**, 247-252
- L 00.00-20 (1998): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln. Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Salmonellen*. Beuth Verlag GmbH, 1-14
- L 00.00-66 (2002): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis von *Salmonellen* in Lebensmitteln mittels enzyymbundenem Fluoreszenzimmunoassay. Beuth Verlag GmbH, 1-5



- L 00.00-67 (2002): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln mittels Impedanz-Verfahren. Beuth Verlag GmbH, 1-12
- LAMBERSKI, N., K. SEURYNCK, C. GREGORY, T.A. MOORE, C.S. PFAFF & R. HINES (2002): Recovery of a pathogenic *Salmonella arizona* from four snakes at the Riverbanks Zoo. *J. Herpetol. Med. Surg.* **12**, 17-22
- LAMM S.H., A. TAYLOR, E.J. GANGAROSA, H.W. ANDERSON, W. YOUNG, M.H. CLARK & A.R. BRUCE (1972): Turtle-associated salmonellosis. I. An estimation of the magnitude of the problem in the United States, 1970-1971. *Am. J. Epidemiol.* **95**, 511-517
- LANG, K. (1961): Über das Problem der universellen Menschenpathogenität der Salmonellen. *Dt. Tierärztl. Wschr.* **68**, 474-477 und 530-534
- LAPAGE, S.P. & S. BASCOMB (1968): Use of selenite reduction in bacterial classification. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 568-580
- LEIFSON, E. (1935): New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Pathol. Bacteriol.* **40**, 581-599
- LEIFSON, E. (1936): New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) Bacilli. *Am. J. Hyg.* **24**, 423-431
- LIE, P.-K. (1968): Untersuchungen über den Salmonellabefall von Kaltblütern. *Arch. Hyg.* **152**, 139-155
- LIEBER, P. (1982): Untersuchung zur Optimierung der Nährbodenkombination im Rahmen der Stuhluntersuchung auf Salmonellen. *Diss. Med., Frankfurt/Main*
- MACCONKEY, A.T. (1908): Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations. *J. Hyg.* **8**, 322-334
- MADSEN, M. (1994): Enumeration of salmonellae in crocodile pond water by direct plate counts and by the MPN technique. *Wat. Res.* **28**, 2035-2037
- MARCUS, L. C. (1983): Amphibien und Reptilien in Heim, Labor und Zoo. *Bakterielle Infektionen.* Enke Verlag Stuttgart, 61-77
- MAYER, H. & FRANK, W. (1977): Vorkommen und Bedeutung von anaeroben Mikroorganismen bei Reptilien und Amphibien. *Ver.ber. Erkr. d. Zootiere* **19**, 93-98
- MAYER, H. & W. FRANK (1974): Bakteriologische Untersuchungen bei Reptilien und Amphibien. *Zbl. Bakteriol. Hyg. 1. Abt. Orig. A* **229**, 470-481
- MCCOY, J.H. (1962): The isolation of salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.* **25**, 213-224
- MCCOY, R.H. & R.J. SEIDLER (1975): Potential pathogens in the environment: Isolation, enumeration and identification of seven genera of intestine bacteria associated with small green pet turtles. *Appl. Microbiol.* **25**, 534-538



- MCKIBBEN, J.S., P.D. PORTERFIELD & J.M. WESTERGAARD (1978): Effect of dry versus wet bowl environment on pet turtles. *Am. J. Vet. Res.* **39**, 109-114
- MCNEIL, E. & W.R. HINSHAW (1946): Salmonella from galapagos turtles, a gila monster and an iguana. *Am. J. Vet. Res.* **7**, 62-63
- MERMIN, J., B. HOAR & F.J. ANGULO (1997): Iguanas and *Salmonella* Marina infection in children: A reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics* **99**, 399-402
- MICHAEL-MARLER, S., M.L. BROWN & R.J. SIEBELING (1983): Eradication of *Arziona hinshawii* from artificially infected turtle eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 748-754
- MILLER, R.G., C.R. TATE, E.T. MALLINSON & J.A. SCHERRER (1991): Xylose-lysin-tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. *Poultry Science* **70**, 2429-2432
- MITCHELL, M.A., S.M. SHANE, K. ORR, J. NEVAREZ, K. MAURER, D. PESTI, S. SANCHEZ, R.E. WOOLEY & B. RITCHIE (2000): Salmonella diagnostic testing in the absence of a gold standard. *Proc. Ass. Reptilian Amphibian Veterinarians*, 143-144
- MÖRK, U. (1997): Untersuchungen über die bakterielle Zusammensetzung der Rachen- und Darmflora von gesunden in Süddeutschland gehaltenen Landschildkröten. *Diss. Med. Vet., München*
- MULINDWA, D.K. & O. PIETZSCH (1979): Studies on the influence of competitive Enterobacteriaceae flora on Salmonella isolation. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **243**, 336-348
- NABBUT, N.H. (1973): Elevated temperature technique for the isolation of salmonellas from sewage and human faeces. *J. Hyg.* **71**, 49-54
- NORTH, W.R. & M.T. BARTRAM (1953): The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* **1**, 130-134
- OBST, J.S. (1988): *Die Welt der Schildkröten*, 2. Auflage, Albert Müller-Verlag, Rüslikon-Zürich-Stuttgart-Wien
- ONDERKA, D.K. & M.C. FINLAYSON (1985): Salmonellae and salmonellosis in captive reptiles. *Can. J. Comp. Med.* **49**, 268-270
- ORÓS, J., J.L. RODRÍGUEZ, P. HERRÁEZ, P. SANTANA & A. FERNÁNDEZ (1996): Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella arizonae* in two snakes. *J. Comp. Pathol.* **115**, 185-189
- OTIS, V.S. & J.L. BEHLER (1973): The occurrence of salmonellae and *Edwardsiella* in the turtles of the New York Zoological Park. *J. Wildlife Dis.* **9**, 4-6
- POPOFF, M.Y. & L. LE MINOR (1997): Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7<sup>th</sup> revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris
- PRUKSARAJ, D. (1967): Untersuchungen über das Vorkommen von Salmonellen bei Landschildkröten der Arten *Testudo graeca* und *Testudo hermanni*. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- RAMBACH, A. (1990): New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 301-303



- RAPPAPORT, E., N. KONFORTI & B. NAVON (1956): A new enrichment medium for certain salmonellae. *J. Clin. Pathol.* **9**, 261-266
- READ, R. B. & A.L. REYES (1968): Variation in plating efficiency of salmonellae on eight lots of brilliant green agar. *Appl. Microbiol.* **16**, 746-748
- REISSBRODT, R. (1995): 9. Alternative Methoden der Isolierung und Identifizierung von Salmonellen, in: KÜHN, H. & H. TSCHÄPE (Hrsg.): *Salmonellosen des Menschen. Epidemiologische und ätiologische Aspekte.* RKI-Schriften 3/95, Medizin Verlag München, 105-117
- RHODES, P. & L.B. QUESNEL (1986): Comparison of Muller-Kauffmann tetrathionate broth with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for the isolation of salmonellas from sewage sludge. *J. Appl. Bacteriol.* **60**, 161-167
- RHODES, P., L.B. QUESNEL & P. COLLARD (1985): Growth kinetics of mixed culture in salmonella enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 231-237
- ROGGENDORF, M. & H.E. MÜLLER (1976): Enterobakterien bei Reptilien. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **236**, 22-35
- ROHDE, R. (1979): Serologische Integration aller bekannten Arizona-Species in das Kauffmann-White-Schema. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A* **243**, 148-176
- ROLLE, M. & A. MAYR (1993): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* MAYR, A. (Hrsg.), 6. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- ROSENSTEIN, B.J., P. RUSSO & M.C. HINGHLIFFE (1965): A family outbreak of salmonellosis traced to a pet turtle. *New England J. Med.* **272**, 960-961
- RUDAT, K.-D., G. Beck, W. FRANK & G. MRUGOWSKY (1966): Über das Vorkommen von Salmonellen bei Reptilien in Zoologischen Gärten. *Pathol. Microbiol.* **29**, 623-629
- RUIZ, J., M.L. NÚÑEZ, J. DÍAZ, M.A. SEMPERE, J. GÓMEZ & M.A. USERA (1996): Note: Comparison of media for the isolation of lactose-positiv *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 571-574
- SANGALINE, M. & O.P. SNYDER (1997): Case history of a *Salmonella enteritidis* outbreak associated with komodo dragons. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* **17**, 14-16
- SANYAL, D., T. DOUGLAS & R. ROBERTS (1997): Salmonella infection acquired from reptilian pets. *Arch. Dis. Childhood* **77**, 345-346
- SCHÖLL, W. (1982): Zum Stand, zur Bedeutung und zur Bekämpfung von Salmonellen bei Schweinen in der DDR. *Mh. Vet.-Med.* **37**, 521-526
- SCHRÖDER, H.-D. (1970): Zur Verbreitung von Salmonellen bei in Gefangenschaft gehaltenen Wildtieren. *Mh. Vet.-Med.* **25**, 547-550
- SCHRÖDER, H.-D. (1984): Zu den prä- und postnatalen Infektionen bei Zootieren. *Ver.ber. Erkr. Zootiere* **26**, 33-40
- SCHRÖDER, H.-D. (1985): Bakterielle Erkrankungen. in: IPPEN, R., SCHRÖDER, H.-D. und ELZE, K. (Hrsg.): *Handbuch der Zootierkrankheiten. Band 1: Reptilien.* Berlin Akademie-Verlag, 333-337



- SCHRÖDER, H.-D. (1990): Zur Bedeutung von bakteriellen Zoonosen bei Wildtieren in Menschenhand. Ver.ber. Erkr. Zootiere **32**, 165-179
- SCHRÖDER, H.-D. & E. KARASEK (1977): Zur Toxizität aus Reptilien isolierter Salmonellen. Ver.ber. Erkr. Zootiere **19**, 87-91
- SELBITZ, H.-J. (1986): Salmonelleninfektionen und Salmonellosen bei Zootieren. Mh. Vet.-Med. **41**, 312-315
- SELBITZ, H.-J. & W.E. ENGELMANN (1984): Die häufigsten bakteriellen Infektionen bei Reptilien. Mh. Vet.-Med. **39**, 383-386
- SELBITZ, H.-J., J.IBARA, K. ELZE, S. SEIFERT, A. BERGMANN, G. HILLE, J. SCHNEIDER & E. SCHEDLICH (1984): Ein Beitrag zur Epizootiologie der Salmonellosen bei Zootieren. Ver.ber. Erkr. Zootiere **26**, 375-382
- SHARMA, R.M. & R.A. PACKER (1969): Evaluation of culture media for the isolation of salmonellae from feces. Appl. Microbiol. **18**, 589-595
- SIEBELING, R.J., P.M. NEAL & W.D. GRANBERRY (1975a): Evaluation of methods for the isolation of *Salmonella* and *Arizona* organisms from pet turtles treated with antimicrobial agents. Appl. Microbiol. **29**, 240-245
- SIEBELING, R.J., P.M. NEAL & W.D. GRANBERRY (1975b): Treatment of *Salmonella-Arizona*-infected turtle eggs with terramycin and chloromycetin by the temperature-differential egg dip method. Appl. Microbiol. **30**, 791-799
- SIEBELING, R.J., D. CARUSO & S. NEUMANN (1984): Eradication of *Salmonella* and *Arizona* species from turtle hatchlings produced from eggs treated on commercial turtle farms. Appl. Environl. Microbiol. **47**, 658-662
- SILLIKER, J.H. & W.I.TAYLOR (1958): Isolation of salmonellae from food samples. Appl. Microbiol. **6**, 228-232
- SILLIKER, J.H., R.H. DEIBEL & P.T. FAGAN (1964): Enhancing effect of feces on isolation of salmonellae from selenite broth. App. Microbiol. **12**, 100-105
- SMITH, H.G. (1959): Observations on the isolation of salmonellae from selenite broth. J. Appl. Bacteriol. **22**, 116-124
- SNOYENBOS, G.H. & V.L. CARLSON (1972): Comparative efficiency of tetrathionate and selenite enrichment broths for the isolation of Arizona serotypes. Avian Dis. **16**, 756-766
- SPINO, D.F. (1966): Elevated-temperature technique for the isolation of *Salmonella* from Streams. Appl. Microbiol. **14**, 591-596
- STELLMACHER, W. & U. BIEWALD (1987): Über eine Modifikation des Mediums nach Rappaport für die Anreicherung von Salmonellen. Mh. Vet.-Med. **42**, 681-684
- STELLMACHER, W. & W. SCHÖLL (1980): Salmonella-Infektionen. in: BEER, J. (Hrsg.): Infektionskrankheiten der Haustiere. 2. Auflage, Jena, Gustav Fischer-Verlag, 431-457



- STOKES, J. L. & W.W. OSBORNE (1955): A selenite brilliant green medium for the isolation of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* **3**, 217-220
- SUEDERMEYER, W. K. (1999): *Salmonella typhimurium* infection in a savannah monitor. *Exotic Pet Practice* **4**, 79
- TAYLOR, W. I. (1965): Isolation of shigellae. *Am. J. clin. Pathol.* **44**, 471-475
- THOMSON, S. (1955): The numbers of pathogenic bacilli in faeces in intestinal diseases. *J. Hyg.* **53**, 217-223
- TRUSCOTT, R.B. (1983): A comparison of two enrichment and two plating media for the isolation of *Salmonella* sp. from broilers. *Can. J. Comp. Med.* **47**, 373-374
- VAN SCHOTHORST, M. & A.M. RENAUD (1983): Dynamics of salmonella isolation with modified Rappaport's medium (R 10). *J. Appl. Bacteriol.* **54**, 209-215
- VAN SCHOTHORST, M., A. RENAUD & C. VAN BEEK (1987): Salmonella isolation using RVS broth and MLCB agar. *Food Microbiology* **4**, 11-18
- VASSILIADIS, P. (1968): *Shigella* spp., *Salmonella choleraesuis* and Arizona in Rappaport's medium. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 367-372
- VASSILIADIS, P. (1983): The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. *J. Appl. Bacteriol.* **54**, 69-76
- VASSILIADIS, P., E. PATERAKI, J. PAPADAKIS & D. TRICHOPOULOS (1974): Evaluation of the growth of salmonellae in Rappaport's broth and in Muller-Kauffmann's tetrathionate broth. *J. Appl. Bacteriol.* **37**, 411-418
- VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, V. KALAPOTHAK & C. SÉRIÉ (1981): Isolation of *Salmonella* with the use of 100 ml of the R 10 modification of Rappaport's enrichment medium. *J. Hyg.* **87**, 35-41
- VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, A. KALANDIDI & E. XIROUCHAKI (1978): Isolation of salmonellae from sewage with a new procedure of enrichment. *J. Appl. Bacteriol.* **44**, 233-239
- VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, G. PAPOUTSAKIS & E. PALLANDIOU (1979): A note on the comparison of two modifications of Rappaport's medium with selenite broth in the isolation of salmonellas. *J. Appl. Bacteriol.* **46**, 567-569
- WATSON, D.C. & A.P. WALKER (1978): A modification of brilliant green agar for improved isolation of *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 195-204
- WEBER, A. & O. PIETZSCH (1974): Ein Beitrag zum Vorkommen von Salmonellen bei Landschildkröten aus Zoohandlungen und Privathaushalten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **87**, 257-260
- WEIL, B.J., P.B. MARTENS, & J.S. HARTE (1995): Iguana-associated salmonellosis in a young adult. *J. Adolescent Health* **17**, 120-121
- WELLS, J.G., G. MCCONNELL CLARK & G.K. MORRIS (1974): Evaluation of methods for isolating *Salmonella* and *Arizona* organisms from pet turtles. *Appl. Microbiol.* **27**, 8-10



- WILL, R. (1975): Die Entstehungsursachen (Ätiologie) der Lebererkrankungen bei Reptilien. Zbl. Vet.-Med. **22**, 626-634
- WILLIAMS SMITH, H. (1952): The evaluation of culture media for the isolation of salmonellae from faeces. J. Hyg. **50**, 21-36
- WILLIAMS SMITH, H. (1959): The isolation of salmonellae from the mesenteric lymph nodes and faeces of pigs, cattle, sheep, dogs and cats and from other organs of poultry. J. Hyg. **57**, 266-273
- WILLIAMS, L.P. & H.L. HELSDON (1965): Pet turtles as a cause of human salmonellosis. J. Am. Med. Ass. **192**, 87-91
- WILSON W. J. (1923): Reduction of sulphites by certain bacteria in media containing a fermentable carbohydrate and metallic salts. J. Hyg. **21**, 392-398
- WILSON, W.J. & E.M. MCV. BLAIR (1926): A combination of bismuth and sodium sulphite affording an enrichment and selective medium for the typhoid-paratyphoid groups of bacteria. J. Pathol. Bacteriol. **29**, 310-311
- WILSON, W.J. & E.M. MCV. BLAIR (1927): Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B. typhosus* and *B. proteus*. J. Hyg. **26**, 374-391
- WILSON, W.J. & E.M. MCV. BLAIR (1931): Further experience of the bismuth sulphite media in the isolation of *Bacillus Typhosus* and *B. Paratyphosus* B from faeces, sewage and water. J. Hyg. **31**, 138-161
- WOODWARD, D.L., R. KHAKHRIA & W.M. JOHNSON (1997): Human salmonellosis associated with exotic pets. J. Clin. Microbiol. **35**, 2786-2790
- WORELL, A., W.B. NELSON, K. VOGEL & G. GOEBEL (1999): Potential zoonotic diseases in exotic pets. Exotic Pet Practice **4**, 57-58
- WUTHE, H.-H, R. RODE, S. ALESKSIC, C. SCHUBERT & S. WUTHE (1979) Über das Vorkommen von Angehörigen des Genus *Salmonella* bei freilebenden Schlangen in Norddeutschland. Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Orig. A **23**, 412-418
- ZWART, P (1998a): Echsen, in GABRISCH, K. & P. ZWART (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, 809-858
- ZWART, P (1998b): Schlangen, in GABRISCH, K. & P. ZWART (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, 751-807







Fortsetzung: Koloniemorphologie der 86 getesteten Salmonellenstämme auf den neun verschiedenen Nährböden nach Subspezies geordnet

| Stamm- Nr.:   | Sub-Spez.     | Tier art | Nährböden |        |        |             |        |        |        |        |                   |
|---------------|---------------|----------|-----------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------|--------|-------------------|
|               |               |          | BPLS      | BS     | DCLS   | HE          | MLCB   | ÖNÖZ   | SS     | XLD    | RAMBACH           |
| ZFF 1519/99   | IIIb          | S        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. lila       |
| ZFF 269/99    | IIIb          | S        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | untyp. | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. blau(grün) |
| ZFF 1484/99   | IIIb          | S        | untyp.    | untyp. | untyp. | typ.        | typ.   | untyp. | untyp. | untyp. | untyp. blau(grün) |
| ZFF 1490/99   | IIIb          | S        | untyp.    | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | untyp. | typ.   | untyp. | untyp. blau(grün) |
| ZFF 863/00    | IIIb          | S        | untyp.    | untyp. | untyp. | un-<br>typ. | untyp. | untyp. | untyp. | untyp. | untyp. blau(grün) |
| ZFF 344/01    | IIIb          | S        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | untyp. | typ.   | typ.   | untyp. lila       |
| NRL-SALM 152  | IV            | E        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| NRL-SALM 162  | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| NRL-SALM 3878 | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 57/99     | IV            | E        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 194/99    | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 521/99    | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 2274/99   | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 743/00    | IV            | E        | typ.      | untyp. | untyp. | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 2821/00   | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 156/01    | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 1517/01   | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 1250/01   | IV            | E        | typ.      | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| NRL-SALM 359  | IV            | S        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 2684/00   | IV            | S        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 3853/00   | IV            | S        | s.-typ    | typ.   | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 148/01    | IV            | S        | typ.      | typ.   | untyp. | typ.        | untyp. | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| NRL-SALM 1740 | IV            | R        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |
| ZFF 137/99    | Rauh-<br>form | E        | typ.      | untyp. | typ.   | typ.        | typ.   | typ.   | typ.   | typ.   | untyp. farblos    |

**Abkürzungen:** CS: von Christine Schramme isolierte Salmonellenstämme; E: Echsen; R: Reptil, keine weitere Angabe; S: Schlangen; SK: Schildkröten; Stamm-Nr.: Salmonellenstamm-Nr.; typ.: salmonel-  
lentypische Koloniemorphologie; untyp.: untypische Koloniemorphologie;



## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Dr. R. Hoffmann für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die prompte und freundliche Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Birgit Oidtmann für die wissenschaftliche Betreuung während der gesamten Promotionszeit und ihr großes Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Christiane Werckenthin, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät für, ihre schnelle und unermüdliche Mitarbeit und ihre konstruktiven Ideen. Auch Herrn Dr. Georg Wolf danke ich herzlich für seine Beratung, ebenso dem ganzen Team für die kollegiale Hilfestellung.

Beim Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät möchte ich mich vor allem bei Frau Privatdozentin Dr. Barbara Schalch für freundliche und kompetente Beratung und beim Laborpersonal für die Einweisung in die Salmonellendiagnostik bedanken.

Dem Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Helmuth danke ich für die Überlassung der Salmonellenstämme und die Übernahme der serologischen Differenzierung weiterer Salmonellenstämme. Bei Frau Dr. Dorn bedanke ich mich für ihre geduldigen telefonischen Auskünfte.

Ebenso Herrn Prof. Dr. H. Tschäpe vom Nationalen Referenzlabor für Salmonellen und seinen Mitarbeitern besten Dank für die freundliche Unterstützung.

Vielen Dank auch Herrn Diplomingenieur Helmut Wagner vom Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft für sein tatkräftiges Engagement und Herrn Dr. Beck vom Landesuntersuchungsamt Oberschleißheim für seine Mithilfe.



Weiterhin danke ich Frau Bilian, die für alles, was mit Literaturangaben zusammenhing, stets ein offenes Ohr hatte.

Ein ganz herzliches Dankeschön natürlich an alle Schildkrötenbesitzer, die ihre Tiere für diese Untersuchung zu Verfügung gestellt haben, für ihre Kooperation.

Ferner gilt mein Dank selbstverständlich allen Mitarbeitern des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten für die freundliche, nette Zusammenarbeit; insbesondere erwähnen möchte ich hier Frau Christine Kühnhauser-Vogt und Herrn Josef Feiling.

Zu guter Letzt, dafür aber umso mehr, bedanke ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern und allen Freunden und Bekannten für die konstruktive Kritik und vielen Denkanstöße, für das Korrekturlesen und die Bewältigung so mancher computertechnischer Probleme und den moralischen Beistand während der Fertigstellung dieser Arbeit.



## LEBENS LAUF

Name: Karola Christine Schramme

Geburtsdatum: 14.3.1969

Geburtsort: Nördlingen

Eltern: Hans-Jürgen Schramme  
Ilse Schramme, geb. Schmidt

Schulbildung: 1975-1979 Grundschule in Oettingen  
1979-1988 Albrecht-Ernst-Gymnasium Oettingen  
Allgemeine Hochschulreife am 29.6.1988

Ausbildung zum Pferdewirt: 1988-1991 Reitschule Manfred Dobs, Bruckdorf  
Abschlussprüfung am 15.11.1991

Tätigkeit als Pferdewirt: 1991 Reitschule Manfred Dobs, Bruckdorf  
1992 Turnier- und Ausbildungsstall Klaus-Peter Wallner, Frauenneuharting

Studium: 1992-1998 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Abschluss mit dem Staatsexamen am 2.2.1998

Approbation: 19.5.1998

Dissertation: Seit 1998 Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München