

Epidemiologische Ausbruchsuntersuchung und Vollgenomanalyse  
der *Salmonella* Dublin Infektion beim Rind in Bayern  
im Zeitraum 2017 bis 2021

von Corinna Maria Klose

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

Epidemiologische Ausbruchsuntersuchung und Vollgenomanalyse  
der *Salmonella* Dublin Infektion beim Rind in Bayern  
im Zeitraum 2017 bis 2021

von Corinna Maria Klose

aus Würzburg

München 2023

Aus dem Veterinärmedizinischen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und  
Lebensmittelsicherheit  
in Erlangen

Mentorin: Prof. Dr. Julia M. Riehm

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Simone M.-L. Renner

Tag der Promotion: 11. Februar 2023

Für meine Familie und Wegbegleiter

## Inhaltsverzeichnis

I.	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
II.	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>4</b>
1.	<b>Salmonellen</b> .....	<b>4</b>
1.1.	<i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i> Serovar Dublin .....	4
1.2.	Pathogenese beim Rind .....	5
1.3.	Krankheitsbilder beim Rind.....	6
1.4.	Krankheitsbilder beim Menschen .....	10
1.5.	Virulenzfaktoren .....	11
1.6.	Vorkommen von <i>Salmonella</i> Dublin in Deutschland und weltweit....	12
2.	<b>Antimikrobielle Resistenzen</b> .....	<b>13</b>
2.1.	Resistenzen <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> und <i>in silico</i> .....	14
2.2.	Resistenzlage von <i>Salmonella</i> Dublin in Deutschland und weltweit ..	15
2.3.	Ausblick auf die Resistenzbestimmung.....	16
3.	<b>Epidemiologische Untersuchungen</b> .....	<b>17</b>
3.1.	Verfahren der epidemiologischen Untersuchungen .....	17
3.2.	Auswertung mit dem Schwerpunkt Almweiden .....	18
4.	<b>Vollgenomanalyse</b> .....	<b>19</b>
4.1.	Verfahren der Vollgenomsequenzierung.....	20
4.1.1.	Illumina Sequenziermethode.....	20
4.1.2.	Pacific Biosciences.....	21
4.1.3.	Oxford Nanopore Technologies.....	22
4.2.	Datenbanken für Salmonellen .....	23
4.2.1.	Datenbanken für Nukleotidsequenzen.....	23
4.2.2.	Identifizierung von Serovaren nach Vollgenomsequenzierung.....	23
4.2.3.	Identifizierung von Virulenzgenen .....	24
4.2.4.	Identifizierung von antimikrobiellen Resistenzgenen .....	24
4.3.	Datenauswertung .....	25
4.3.1.	Software .....	25
4.3.2.	Analysemethoden .....	26

Inhaltsverzeichnis	VII
4.3.3. Epidemiologische Untersuchungen und deren Einbeziehung in Laborergebnisse .....	27
4.4. Ausblick auf die Vollgenomanalyse von Salmonellen.....	28
<b>III. PUBLIKATION .....</b>	<b>30</b>
<b>IV. DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>
<b>1. One Health und aktuelle Entwicklung der Resistenzlage.....</b>	<b>48</b>
<b>2. Probenahme und Labordiagnostik .....</b>	<b>50</b>
<b>3. Prophylaxe und Therapie .....</b>	<b>53</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>
<b>VI. SUMMARY.....</b>	<b>60</b>
<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>VIII. DANKSAGUNG.....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
cgMLST	core genome Multilocus Sequence Typing
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Cluster Type
DDBJ	DNA Databank of Japan
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
DT	Definitive Type
DTU	Technische Universität Dänemark
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENA	Europäische Nukleotid-Archiv
ENA	Europäisches Nukleotid-Archiv
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
INSDC	Internationale Nukleotid Sequenz Datenbank Kollaboration
KbE	Koloniebildende Einheiten
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisierung-Flugzeit Massenspektrometrie
MLST	Multilocus Sequence Typing
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
O-Antigene	outer membrane Antigene
PacBio	Pacific Biosciences
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q <sub>30</sub>	Qualitätsfaktor von 30
RGI	Resistance Gene Identifier
S. Dublin	<i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i> Serovar Dublin
SMRT	Single-Molecule Real-Time
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPI	Salmonella-Pathogenitätsinseln
<i>spv</i>	<i>Salmonella</i> plasmid virulence Gene
ST10	Sequenztyp 10
Th	T-Helferzellen
TSN	Nationales Tierseuchennachrichtensystem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VFDB	Virulenzfaktor Datenbank
wg	whole genome / Vollgenom
wgMLST	Vollgenom Multilocus Sequence Typing
wgSNP	Vollgenom Single Nucleotide Polymorphism
WHO	Weltgesundheitsorganisation



Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Übersicht der Krankheitsverläufe von *Salmonella* Dublin beim Rind.  
Modifiziert nach Nielsen (NIELSEN, 2013)

**Tabelle 2:** Salmonellosen und Nachweise von *Salmonella* Dublin bei Rind und Mensch 2017 bis 2020 in Deutschland (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019; METHNER, 2020, 2021; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021a)

## I. EINLEITUNG

*Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Dublin (*S. Dublin*) zählt neben der Serovar Typhimurium zu den beiden häufigsten Salmonellen, die beim Rind in Deutschland diagnostiziert werden (METHNER, 2020, 2021). Wie mehrfach publiziert sind *S. Dublin* Fälle bei Menschen und Rindern weltweit regional gehäuft zu finden. Daher beschreiben verschiedene Autoren individuelle Endemiegebiete für das Vorkommen dieser Serovar (MCDONOUGH et al., 1999; AGREN et al., 2016; KUDIRKIENE et al., 2020). Auch in Deutschland kommt *S. Dublin* gehäuft in abgegrenzten Regionen vor (GARCIA-SOTO et al., 2021). Sachverständige des Friedrich-Loeffler-Instituts sprechen sogar von einem endemischen Vorkommen in bestimmten Landkreisen, darunter einige in Bayern (METHNER, 2021). Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wurde *S. Dublin* in den letzten Jahren ausschließlich in den südlichen Regierungsbezirken Ober- und Niederbayern nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es, Daten zur epidemiologischen Lage und zur Diagnostik von *S. Dublin* in Bayern in den Jahren 2017 bis 2021 auszuwerten. Weiterhin sollten Resistenzlage sowie mögliche Virulenzfaktoren mittels molekularer und *in vitro* Verfahren von diesem Zoonoseerreger charakterisiert werden.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Salmonellen

Pathogene Bakterien der Gattung *Salmonella* wurden erstmals im Jahre 1880 von Karl Joseph Eberth beschrieben. Benannt wurde die Spezies 1900 durch Joseph Leon Lignières, zu Ehren der Arbeitsgruppe des amerikanischen Tierarztes Daniel Elmer Salmon. Die gramnegativen Stäbchenbakterien gehören zur Familie der Enterobacteriaceae, wachsen fakultativ anaerob und intrazellulär, mit einer Größe von 0,7-1,5 µm x 2,0-5,0 µm. Aufgrund ihrer peritrichen Begeißelung sind Salmonellen bis auf wenige Ausnahmen beweglich (SELBITZ et al., 2015). Im aktuell gültigen White-Kauffmann-Le Minor Schema sind über 2600 Serovare beschrieben (GRIMONT & WEILL, 2007; JAJERE, 2019).

Aufgrund ihrer Vermehrungsfähigkeit zwischen 8 und 45 °C sowie der pH-Wert Toleranz zwischen 4 und 9 sind Salmonellen vergleichsweise stabil gegenüber Umwelteinflüssen. Jedoch sind Salmonellen beim Wachstum auf eine feuchte Umgebung mit einem  $a_w$ -Wert von mindestens 0,94 angewiesen. Salmonellen bilden keine Sporen, können jedoch in einem sogenannten „viable but non-culturable“ Dauerzustand über einen langen Zeitraum in der Umwelt infektiös bleiben (SELBITZ et al., 2015; MAYNAUD et al., 2016). In warmer, feuchter und nährstoffreicher Umgebung können sich die Bakterien zudem außerhalb eines Wirts vermehren (WRAY & DAVIES, 2000).

Beim Menschen ist die Salmonellose weltweit eine ernstzunehmende, meist lebensmittelbedingte Infektion, an der jährlich zahlreiche Menschen erkranken (POPA & PAPA, 2021). In Europa ist die Salmonellose die zweithäufigste bakterielle Ursache für gastrointestinale Infektionen beim Menschen (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2020).

#### 1.1. *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Dublin

*Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Dublin (*S. Dublin*) wurde erstmals im Jahr 1902 von Mohler und Buckley bei einem adulten Rind in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) als *Bacillus* der Enteritidis-Gruppe beschrieben

(MOHLER, 1903; WRAY & DAVIES, 2000). Inzwischen gehört *S. Dublin* beim Rind in Deutschland zu den beiden am häufigsten nachgewiesenen Serovaren (METHNER, 2021). Obwohl die genaue Grundlage der Wirtsspezifität bislang nicht erklärt werden konnte, gilt *S. Dublin* als an das Rind adaptiert (NIELSEN, 2013).

### **1.2. Pathogenese beim Rind**

Die Infektion mit *S. Dublin* erfolgt meist alimentär oder oral, über kontaminierte Futtermittel, Tränke, Gegenstände, sowie nach Kontakt mit Ausscheidern (NAZER & OSBORNE, 1977; FOSTER et al., 2021). Seltener erfolgt die Infektion über die Atemwege oder Konjunktiven (NAZER & OSBORNE, 1977). Die Inkubationszeit beträgt ein bis vier Tage (DIRKSEN, 2002).

Das Eindringen von Salmonellen in Enterozyten von Jejunum und Ileum erfolgt vermutlich über die M-Zellen der Peyerschen Platten mittels Makropinozytose (BÄUMLER et al., 2000; PULLINGER et al., 2007). Alternativ gelangt der Erreger auch auf extrazellulärem Weg in die Mesenteriallymphknoten, wo er über Wochen oder Monate persistieren kann (PULLINGER et al., 2007). Bestimmten *S. Dublin* Stämmen gelingt es jedoch in Makrophagen einzudringen und diese als Transportvehikel und Replikationsort zu nutzen (SEGALL & LINDBERG, 1991; WALLIS et al., 1995). Diese Fähigkeit ist Voraussetzung für eine generalisierte Ausbreitung der Infektion. Je nach Empfänglichkeit des Wirtes können – ausgehend von den Mesenteriallymphknoten – Leber, Milz, Tonsillen, weitere Lymphknoten und die Lunge befallen werden (SEGALL & LINDBERG, 1991; PULLINGER et al., 2007).

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran von Salmonellen. Diese präsentieren sogenannte outer membrane oder O-Antigene, darunter das Endotoxin Lipid A. Letzteres wirkt stark toxisch für Wirtszellen und wird beim Absterben der Bakterien freigesetzt. In Folge kommt es durch Monozyten und Makrophagen zu einer Zytokinausschüttung, die Gefäße und Gewebe schädigen und Thrombosen auslösen kann. Das Syndrom des Endotoxinschocks führt zu Hyperthermie, disseminierter intravasaler Koagulopathie und Kreislaufversagen (RYCROFT, 2000; NIELSEN, 2013).

Im Stoffwechsel von Salmonellen werden Enterotoxine frei, die im Darm des Wirts das Krankheitsbild der Enterokolitis hervorrufen können. In den Enterozyten führen diese Toxine zu einer Steigerung der Chloridsekretion und hemmen die Natriumresorption. Dadurch kommt es zu einer ausgeprägten Hyponatriämie, zum übersteigerten Verlust von Flüssigkeit, Elektrolyten und Proteinen in Form der klinischen Diarrhoe. Ein rascher Gewichtsverlust wird verursacht (DIRKSEN, 2002). Salmonellen können in der Gallenblase temporär oder – im Falle von Dauerausscheidern über einen langen Zeitraum – persistieren. Von dort gelangt der Erreger intermittierend in den Dünndarm. Die Ausscheidung des Erregers erfolgt hauptsächlich über Darminhalt, seltener über Urin, Milch, Vaginalausfluss und Speichel (NIELSEN, 2013; FOSTER et al., 2021).

### 1.3. Krankheitsbilder beim Rind

Das klinische Bild einer *S. Dublin* Infektion beim Rind wird maßgeblich durch drei Parameter bestimmt (WALLIS et al., 1995; QUINN, 2002; NIELSEN, 2013):

- Infektionsdosis,  
Anzahl oral aufgenommener Erreger  $> 10^6$  koloniebildende Einheiten (KbE)
- Virulenz des Stamms
- Empfänglichkeit des Wirtsorganismus unter Berücksichtigung von Alter, Immunstatus, Genetik und Konstitution

Rinder in Herden mit wenigen bis keinen Ausscheidern haben ein hohes Risiko sich mit *S. Dublin* aus externen Quellen zu infizieren (NIELSEN et al., 2004a). Dabei kann das klinische Bild einer Infektion mit *S. Dublin* stark variieren (WRAY & DAVIES, 2000). Die verschiedenen Infektionsstadien mit ihren Merkmalen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Zeitgleiche parasitäre Infestationen oder virale Infektionen, beispielsweise durch *Fasciola hepatica* oder mit dem Bovinen Virus Diarrhoe Virus, steigern die Empfänglichkeit des Wirtstieres für Salmonellen und führen zu vergleichsweise schwereren Krankheitsverläufen (RICHARDSON & WATSON, 1971; VAESSEN et al., 1998; WRAY & DAVIES, 2000; DIRKSEN, 2002).

Typisch für eine Infektion mit *S. Dublin* sind Aborte (CARRIQUE-MAS et al., 2010). In Großbritannien stellt *S. Dublin* nach *Neospora* die zweithäufigste Abortursache

bei Milchkühen dar (OTTER, 2020). In Betrieben mit hohen Infektionsraten kann es bei adulten Kühen ohne jegliche Anzeichen einer Infektion zu Aborten in der zweiten Trächtigkeitshälfte kommen (HINTON, 1977; DIRKSEN, 2002; NIELSEN et al., 2004a; CARRIQUE-MAS et al., 2010). Auch Nachgeburtverhalten, Totgeburten und die Geburt infizierter Kälber nach intrauteriner Infektion sind beschrieben (HINTON, 1974; DIRKSEN, 2002; FOSTER et al., 2021).

Bei laktierenden Rindern kann Milchrückgang ein Symptom sein, das zu hohen gesamtwirtschaftlichen Einbußen führt (DIRKSEN, 2002; NIELSEN et al., 2013; KUDIRKIENE et al., 2020). Darüber hinaus kann der Zoonoseerreger über die Milch ausgeschieden werden (NIELSEN, 2013).

Die Kälbersterblichkeit bei einer Infektion mit *S. Dublin* beträgt bis zu 30 % (HOUSE et al., 1993). Neonatale Kälber infizieren sich oral über die Muttermilch oder Ausscheidungen der Mutterkuh (NAZER & OSBORNE, 1977; NIELSEN et al., 2004a). Besonders empfänglich sind Saugkälber. Häufig erkranken diese zwischen der vierten und fünften Lebenswoche (NAZER & OSBORNE, 1977; WRAY & DAVIES, 2000; NIELSEN, 2013). Unter anderem äußert sich eine *S. Dublin* Infektion bei Kälbern durch Diarrhoe bis hin zu Lebensschwäche, Septikämie und Tod (DIRKSEN, 2002; PULLINGER et al., 2007; FOSTER et al., 2021). Des Weiteren ist bei Kälbern auch die Form der Zystitis mit Ausscheidung des Erregers über den Urin beschrieben (COSTA et al., 2018). Beim klinischen Bild der Diarrhoe kommt es zu einer massenhaften Ausscheidung von Salmonellen. Hierdurch steigen Umgebungs-, Umweltkontamination und somit der Infektionsdruck für andere Tiere in der Umgebung erkrankter Kälber massiv an (DIRKSEN, 2002). Kontaminierter Kot spielt die bedeutendste Rolle bei der Übertragung von *S. Dublin* (NIELSEN, 2013).

Eine Besonderheit nach einer Infektion mit *S. Dublin* stellen klinisch inapparente Trägertiere dar (WRAY & DAVIES, 2000). Tiere werden mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu Trägertieren, wenn sie während der Infektion geringen Keimzahlen ausgesetzt waren. Im Gegensatz dazu genesen eher solche Tiere, die während der Infektion hohen Keimzahlen ausgesetzt waren (NIELSEN et al., 2004a). Besonders Färsen und Kühe  $\pm$  70 Tage um den Abkalbetermin haben im Falle einer Infektion ein erhöhtes Risiko, Trägertiere zu werden (NIELSEN et al.,

2004a). Zusätzlich werden ungefähr 5 % der genesenen Kälber zu Trägertieren (FOSTER et al., 2021).

Ein wichtiger Aspekt für die epidemiologische Interpretation der Übertragungswahrscheinlichkeit ist, dass Trägertiere unter Stress häufig zu Ausscheidern werden. Ursache dafür ist, dass die Stresssituationen zu einer Störung der normalen Darmfunktion führen. Dadurch haben Salmonellen die Möglichkeit sich zu vermehren, anzuhaften und in die Darmzellen einzudringen (NIELSEN, 2013). Mögliche Stresssituationen können sein:

- Körperliche Anstrengung wie zum Beispiel Trächtigkeit, Partus und Hochlaktation (DIRKSEN, 2002; QUINN, 2002)
- Co-Infektionen mit Parasiten oder Mikroorganismen (QUINN, 2002)
- Umweltfaktoren und Haltungsbedingungen wie zum Beispiel extreme Außentemperaturen, hohe Tierdichte, Futterumstellung, schlechte Futterqualität, Hungern, Wassermangel (QUINN, 2002; NIELSEN, 2013)
- Vermarktung und Transport (DIRKSEN, 2002; QUINN, 2002)
- Iatrogene Einflüsse wie zum Beispiel orale Antibiose oder operative Eingriffe mit Narkose (QUINN, 2002)

*S. Dublin* wird häufig auch bei Rindern ohne klinische Symptome nachgewiesen (KLOSE et al., 2022). Stammabhängig kann *S. Dublin* nur als Darmpassant auftreten ohne eine Invasion der Darmlymphknoten. Die Ausscheidung endet in diesem Fall etwa zwei Wochen nach dem letzten Erregerkontakt (RICHARDSON, 1975).

Die Wirtsspezifität von *S. Dublin* führt zwar dazu, dass die Infektion häufig auf das Rind beschränkt bleibt, es können jedoch auch andere Tierarten zum Teil schwer erkranken. So wurde die Septikämie eines Hundes aus England ursächlich auf *S. Dublin* zurückgeführt (MILSTEIN, 1975). Allerdings sind auch diverse Fälle von asymptomatischen Hunden beschrieben (PHILBEY et al., 2014; KLOSE et al., 2022). Dokumentiert sind Aborte, Totgeburten und erhöhte Mortalitätsraten nach *S. Dublin* Infektion von Nerz und Fuchs in dänischen Pelzfarmen (DIETZ et al., 2006).



<i>Salmonella</i> Dublin Infektion beim Rind						
Akute Infektion		Persistierende Infektion				
	Perakut	Akut	Chronisch	Passive Träger	Latente Träger	Aktive Träger
Charakteristiken der Infektion	Bakteriämie gefolgt von Endotoxinschock, häufig in naiven Herden	Lokal im Darm oder systemisch mit transientscher Bakteriämie, Hyperthermie, Apathie, Inappetenz, blutige/wässrige Diarrhoe Kälber: Pneumonie, Arthritis, selten ZNS-Symptome Adulte: Aborte, reduzierte Milchleistung	In Folge akuter Infektionen bei Kälbern älter als 6-8 Wochen, Kümern, blutiger/breiiger Kotabsatz, geringgradige Hyperthermie, Arthritis oder Osteomyelitis mit Lahmheit, ischämische Nekrosen der Akren	Subklinisch, Bakterien bleiben im Darmlumen ohne Invasion des Darmepithels	Subklinisch, Bakterien befinden sich im lymphatischen Gewebe, Reaktivierung durch Stress oder andere unbekannte Einflüsse	Subklinisch, Bakterien im Darmlumen, Darm-assoziierten Gewebe, Lymphsystem und inneren Organen
Dauer	1-2 Tage	1-3 Wochen, bis zu 9 Wochen	Monate	Wochen bis Monate	Monate bis Jahre	Monate
Ausscheidung von Bakterien	Keine	Kontinuierlich oder intermittierend, große Mengen über Kot, Urin, Vaginalausfluss, Milch	Mit und ohne Ausscheidung möglich	Periodisch über Kot bis Infektionsquelle entfernt wird	Keine Ausscheidung bis zur Reaktivierung, dann geringe Mengen	Kontinuierlich oder intermittierend, Bakterienmenge wie bei akuter Infektion

**Tabelle 1:** Übersicht der Krankheitsverläufe von *Salmonella* Dublin beim Rind. Modifiziert nach Nielsen (NIELSEN, 2013)

#### 1.4. Krankheitsbilder beim Menschen

Der Zoonoseserreger *S. Dublin* ist zwar vornehmlich an das Rind adaptiert, es werden jedoch auch Infektionen beim Menschen beschrieben. Der Mensch infiziert sich meist nach Verzehr kontaminierter Rohmilch, Rohmilchprodukten oder rohem beziehungsweise unzureichend gegartem Rindfleisch (FANG & FIERER, 1991; KRAUSS et al., 2004; HARVEY et al., 2017). Zudem können Schmutz- und Schmierinfektionen bei Kontakt mit oben genannten Nahrungsmitteln indirekt zu einer Infektion führen (KRAUSS et al., 2004). Der direkte Kontakt mit Tieren stellt seltener eine Infektionsgefahr dar (FANG & FIERER, 1991). Eine zwischenmenschliche Übertragung oder eine Übertragung auf den Menschen von anderen Tierarten als dem Rind wurde bisher nicht beschrieben.

Erkrankungen und schwere Verläufe treten insbesondere bei Patienten mit Immunschwäche oder Vorerkrankungen wie Tumorerkrankungen, Diabetes mellitus oder Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus auf (FANG & FIERER, 1991; LIEBANA et al., 2002; KRAUSS et al., 2004). Zudem wird *S. Dublin* häufiger bei älteren Patienten nachgewiesen als andere Salmonellen Serovare. Der Median des Alters der Patienten mit *S. Dublin* Infektion liegt aktuell bei 55 Jahren, bei anderen Serovaren jedoch bei 23 Jahren. Kinder infizieren sich seltener, männliche Patienten hingegen häufiger mit *S. Dublin*. Letztere vermutlich bedingt durch häufigeren Konsum von rohem Fleisch (HARVEY et al., 2017). *S. Dublin* wird in Gelenken von Patienten nach Implantation von Endoprothesen häufiger als andere Serovare nachgewiesen (EL SAYED et al., 2018).

Die Inkubationszeit beträgt, abhängig von der aufgenommenen Keimmenge, 7 bis 72 Stunden (KRAUSS et al., 2004). Die Symptome reichen von Diarrhoe, Übelkeit, selbstlimitierendem Erbrechen, abdominellen Schmerzen bis hin zu Fieber und in seltenen Fällen Atemnot (FANG & FIERER, 1991; KRAUSS et al., 2004). Sehr selten wurden Hautläsionen bei Menschen nach direktem Kontakt zu infektiösen Tieren beschrieben (WILLIAMS, 1980; GILLIANS et al., 1982).

Der labordiagnostische Nachweis gelingt während einer Infektion mit *S. Dublin* je nach Symptomatik mittels Blutkultur, Stuhlproben, Abstrichtupfern aus dem

Respirationstrakt, Probenmaterial aus dem zentralen Nervensystem und weiteren betroffenen Organen (FANG & FIERER, 1991).

Bei gastrointestinalem Verlauf ohne Komplikationen genesen Patienten meist innerhalb von ein bis zwei Tagen (KRAUSS et al., 2004). Dagegen liegt die Mortalitätsrate im akuten Fall sowie innerhalb eines Jahres nach einer Infektion bei *S. Dublin* im Vergleich zu anderen Serovaren besonders hoch. Diese ist durch die höhere Invasivitätsrate zu erklären. Resultierende Generalisierung der Infektion und Sepsis führen häufiger zu Hospitalisierungen und Todesfällen (FANG & FIERER, 1991; HELMS et al., 2003; HARVEY et al., 2017).

### 1.5. Virulenzfaktoren

Die Invasivität von *S. Dublin* ist ursächlich auf Virulenzfaktoren zurückzuführen, die auch die Schwere des klinischen Bilds beim Menschen abbilden. Die genauen Grundlagen dafür konnten bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden werden (MOHAMMED & CORMICAN, 2016; MOHAMMED et al., 2017).

Eine Komponente ist das Invasom, das aus zwei Typ-VI-Sekretionssystemen besteht, codiert auf *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI), dem Prophagen Gifsy-2 und den Virulenzgenen *ggt* und *PagN* (MOHAMMED et al., 2017). Im Typ VI Sekretionssystem auf SPI-6 liegen Gene, die für das Shiga-ähnliche Toxin A codieren. Gifsy-2 Prophage wurde in allen in der Studie untersuchten *S. Dublin* Isolaten nachgewiesen und codiert für einige Dutzend Virulenzfaktoren (MOHAMMED & CORMICAN, 2016). Das Virulenzgen *ggt* codiert für Gamma-Glutamyltransferase und inhibiert vermutlich die T-Zell-Proliferation (SCHMEES et al., 2007). Das Invasionsgen *PagN* codiert für ein Protein der äußeren Membran, das wahrscheinlich an der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen beteiligt ist (LAMBERT & SMITH, 2008; MOHAMMED & CORMICAN, 2016).

Das Virulenz-Antigen „Vi“ ist nicht bei allen *S. Dublin* Isolaten vorhanden (GRIMONT & WEILL, 2007). Die Codierung der Vi-Proteine liegt im *viaB* Locus auf SPI-7 und soll in Zusammenhang mit der Invasivität stehen (PICKARD et al., 2003). Das Vi-Antigen wirkt gegen Opsonierung und Phagozytose durch Reduktion des Tumornekrosefaktors  $\alpha$ , der durch Makrophagen ausgeschüttet wird. Zusätzlich wird die Resistenz der Bakterienzellen gegenüber oxidativem Stress erhöht

(LOONEY & STEIGBIGEL, 1986; HIROSE et al., 1997). Jedoch werden auch bei schweren Erkrankungsfällen kaum *S. Dublin* Isolate mit Vi-Antigen nachgewiesen (MOHAMMED & CORMICAN, 2016; MOHAMMED et al., 2016; MOHAMMED et al., 2017). Es ist beschrieben, dass daher das Vi-Antigen nicht allein für die Virulenz von *S. Dublin* verantwortlich sein kann (MOHAMMED et al., 2017).

*Salmonella plasmid virulence* Gene (*spv*) sind auf Plasmiden codiert (DIRKSEN, 2002). Ursprünglich wurde diesen eine ausschlaggebende Rolle für Invasivität und folglich für die systemische Infektion zugeschrieben (WALLIS et al., 1995; DIRKSEN, 2002). Da aber nicht bei allen Isolaten aus systemischen Infektionen *spv*-Gene nachgewiesen wurden, scheint diese Theorie widerlegt oder zumindest unvollständig zu sein (MOHAMMED et al., 2017). Die *spv*-Gene bleiben über viele Generationen stabil. Deshalb ist es wichtig zu beachten, dass während einer antibiotischen Behandlung Virulenzfaktoren, die auf Resistenzplasmiden liegen, ebenfalls selektiert werden (OLSEN et al., 1990; HARVEY et al., 2017).

#### **1.6. Vorkommen von *Salmonella* Dublin in Deutschland und weltweit**

*S. Dublin* gehört zu den beiden häufigsten Serovaren beim Rind in Deutschland (METHNER, 2021). Jährlich werden um die 30 Ausbrüche gemeldet, von denen ein großer Teil in bekannten Endemiegebieten angesiedelt ist. Isolate aus Clustern sind über ganz Deutschland verteilt oder beschränkt auf eine Region. Bisher wurde keine Übertragung von oder nach Frankreich, Dänemark oder Schweden nachgewiesen (GARCIA-SOTO et al., 2021). Humaninfektionen mit Salmonellen in Deutschland werden zu einem sehr geringen Prozentsatz von *S. Dublin* ausgelöst (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021a). Aus diesem Grund werden nachfolgend in Tabelle 2 Einzelinfektionen beim Menschen aufgeführt anstelle der Anzahl der Ausbrüche wie beim Rind.

Ausbruch von	Wirt	2017	2018	2019	2020
Salmonellose	Rinderherde	106	98	131	94
	Mensch	267	274	277	109
<i>Salmonella</i> Dublin	Rinderherde	37	44	39	30
	Mensch	11	7	10	5

**Tabelle 2:** Salmonellosen und Nachweise von *Salmonella* Dublin in Rinderherden und beim Menschen in den Jahren 2017 bis 2020 in Deutschland (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019; METHNER, 2020, 2021; ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021a).

Daten aus Österreich belegen *S. Dublin* Endemiegebiete für Tirol und Salzburg (ALLERBERGER et al., 2003). Betroffene Areale, die auch Almen beinhalten, grenzen direkt an bayerische Endemiegebiete (KLOSE et al., 2022).

Publikationen aus Frankreich, Dänemark und Schweden beschreiben ebenfalls Endemiegebiete in bestimmten geografischen Regionen (AGREN et al., 2016; VIGNAUD et al., 2017; KUDIRKIENE et al., 2020). In anderen europäischen Ländern ist von einer ähnlichen Situation auszugehen. Im Vereinten Königreich ist *S. Dublin* sogar die am häufigsten nachgewiesene Serovar beim Rind (CARRIQUE-MAS et al., 2010).

*S. Dublin* wird weltweit sowohl bei Rindern als auch bei Menschen nachgewiesen. Im Gesundheitswesen wird diese Serovar aufgrund der hohen Mortalitätsrate bei Humaninfektionen als eine globale Bedrohung eingeordnet (HARVEY et al., 2017).

## 2. Antimikrobielle Resistenzen

Antimikrobielle Resistenzen gibt es mutmaßlich bereits länger als die Menschheit selbst und weit vor dem Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin. In der Evolution haben Organismen auch in natürlichen Lebensräumen einen bedeutenden Selektionsvorteil gegenüber denen, die keine antimikrobiell wirksamen Substanzen produzieren können (VAN DUIJKEREN et al., 2018). Resistenzen können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Natürliche und erworbene Resistenzen (REYGAERT, 2018).

Natürliche Resistenzen können intrinsisch vorkommen, das heißt bei einer bestimmten Bakterienspezies werden sie immer exprimiert. Alternativ können sie induziert sein, zum Beispiel durch Kontakt mit einem Antibiotikum werden die zuständigen Gene aktiviert (REYGAERT, 2018). Beispiele für intrinsische Resistenzen sind: Unzugänglichkeit einer Zielstruktur, effektive Effluxpumpen, Produktion von inaktivierenden Enzymen (REYGAERT, 2018; VAN DUIJKEREN et al., 2018).

Erworbene Resistenzen haben ihren Ursprung im Austausch von genetischen Resistenzgenen zwischen Organismen oder durch Mutationen der chromosomalen DNA. Resistenzgene werden häufig in Form von Plasmiden übertragen, weniger häufig durch Bakteriophagen. Mutationen, die zu Resistenzen führen, entstehen auf Genabschnitten, die für Zielstrukturen von Antibiotika, Transporter in der Zellwand oder inaktivierende Enzyme codieren (REYGAERT, 2018; VAN DUIJKEREN et al., 2018).

Antimikrobielle Resistenzen aus Zoonose- und Lebensmittelerregern, wie zum Beispiel Salmonellen, stellen eine wachsende Bedrohung für das Gesundheitswesen dar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

### **2.1. Resistenzen *in vivo*, *in vitro* und *in silico***

Die Korrelation zwischen antimikrobiellen Resistenzen *in vivo* und *in vitro* ist seit Jahrzehnten wissenschaftlicher Konsens (FANTIN et al., 1991; RANJBAR MALIDAREH et al., 2013). Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) für die Bewertung von Ergebnissen aus *in vitro* Testungen beziehen sich mit spezifischen Werten zu Tierart-Bakterium-Wirkstoff-Kombinationen auf diese Korrelation und somit die Wahrscheinlichkeit der Wirksamkeit der getesteten Substanz im Tier (CLSI, 2020; EUCAST, 2022). Seit einigen Jahren gibt es durch die Vollgenomsequenzierung die Möglichkeit der *in silico* Suche nach Resistenzgenen. Auch hier wurde eine hohe Übereinstimmung mit der *in vitro* Diagnostik nachgewiesen. Somit gilt die *in silico* Methode als verlässliches Mittel zur Resistenzbestimmung (CARROLL et al., 2017; PAUDYAL et al., 2019; BHARAT et al., 2022).

## 2.2. Resistenzlage von *Salmonella* Dublin in Deutschland und weltweit

*S. Dublin* weist im Vergleich zu anderen Serovaren in Deutschland und Europa kaum Resistenzen auf (KUDIRKIENE et al., 2020; GARCIA-SOTO et al., 2021; EFSA, 2022; KLOSE et al., 2022). Zwischen 2005 und 2018 wurde in Deutschland nur ein *S. Dublin* Isolat beschrieben, das eine Multiresistenz aufwies (GARCIA-SOTO et al., 2021).

Seit Jahren steigt dagegen in den USA die Anzahl der multiresistenten Isolate an. Bei 55 % der *S. Dublin* Isolaten wurden Multiresistenzen nachgewiesen, im Vergleich zu 12 % bei anderen Serovaren (HARVEY et al., 2017). Von 1968 bis 2013 nahmen dort die Infektionszahlen mit *S. Dublin* bei Menschen zu, im Vergleich zu relativ stabil bleibenden Infektionen mit anderen Serovaren (Inzidenzen pro 100.000 Einwohnern). Im gleichen Zeitraum stieg zudem die Hospitalisations- und Sterberate. Man vermutet einen Zusammenhang mit den zeitgleich zunehmenden Multiresistenzen ( $\geq 7$  Substanzklassen) (HARVEY et al., 2017). Hinsichtlich der Resistenzlage wurde kein Unterschied zwischen Isolaten menschlicher oder tierischer Herkunft festgestellt (CARROLL et al., 2017). Auch in Lebensmittelisolaten wurden Resistenzen gefunden (EYLER et al., 2020). In Kanada kam es 2010 ebenfalls zu einem Anstieg der Infektionen von Menschen mit multiresistenten *S. Dublin* Stämmen (MANGAT et al., 2019).

Bei der Suche nach der Ursache von zunehmenden Resistenzen konnten Plasmide identifiziert werden, die bei *S. Dublin* Isolaten aus bestimmten geografischen Regionen nachgewiesen wurden und den weltweiten Anstieg der Resistenzlage erklären (HARVEY et al., 2017; MANGAT et al., 2017; MOHAMMED et al., 2017; FENSKE et al., 2019; KUDIRKIENE et al., 2020). Dabei ergab sich, dass die Evolution des Genoms von *S. Dublin* eher an geografische Faktoren geknüpft und wirtsunabhängig ist (FENSKE et al., 2019). Diagnostisch erlauben die aktuell stark zunehmenden Mengen und die Verfügbarkeit von Daten aus der Vollgenomsequenzierung weltweit eine umfassende Überwachung der Resistenzentwicklung von *S. Dublin* (ALCOCK et al., 2020; BHARAT et al., 2022).

### 2.3. Ausblick auf die Resistenzbestimmung

Die herkömmliche Resistenzbestimmung mittels Mikrodilutionsverfahren oder Plättchendiffusionstest ist zeitaufwändig. Bei schwer erkrankten Patienten muss daher eine antimikrobielle Therapie eingeleitet werden bevor mögliche Resistenzen des Erregers bestimmt sind. Die Forschung richtet daher den Fokus auf schnellere Alternativen verglichen mit den klassischen Methoden der Resistenzbestimmung (VAN BELKUM & DUNNE, 2013). Es folgt eine Auswahl an vielversprechenden Ansätzen, die künftig für die Resistenzbestimmung in der Routinediagnostik weiterentwickelt werden könnten (VAN BELKUM & DUNNE, 2013).

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisierung-Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) kann auf drei Wegen zur Bestimmung antimikrobieller Resistenzen eingesetzt werden: Die Bestimmung der Aktivität von Antibiotika-inaktivierenden Enzymen, Nachweis eines PCR-Produkts das auf antimikrobielle Resistenz hinweist und Messung des veränderten Proteinspektrums eines Bakteriums unter Verwendung einer antimikrobiell wirkenden Substanz (VAN BELKUM & DUNNE, 2013; YOON & JEONG, 2021).

Mittels Durchflusszytometrie kann mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen die Anzahl abgestorbener Bakterienzellen nach Kontakt mit einer antimikrobiell wirkenden Substanz gemessen werden (VAN BELKUM & DUNNE, 2013).

Eine Multiplex-PCR für den Nachweis von Resistenzdeterminanten ist bisher nicht für *S. Dublin* beschrieben, könnte jedoch aufgrund genetischer Ähnlichkeiten aus einer Veröffentlichung über *S. Typhimurium* übertragen werden (KHAN et al., 2000). Der Nachteil einer PCR ist die Beschränkung auf bestimmte Resistenzmerkmale (VAN BELKUM & DUNNE, 2013).

Die Vollgenomsequenzierung ermöglicht die Detektion sowohl von erworbenen Resistenzgenen als auch Mutationen, die zu antimikrobiellen Resistenzen führen. Jedoch kann die auf genetischen Elementen basierende Vollgenomanalyse die *in vitro* Diagnostik, welche der Situation im Organismus am ähnlichsten ist, aktuell noch nicht ersetzen. Ein weiterer Aspekt ist, dass neu entstehende Resistenzgene



oder Mutationen, die nicht in den Datenbanken erfasst sind, nicht als solche identifiziert werden. Des Weiteren spielen die hohen Kosten in der derzeit noch beschränkten Akzeptanz eine große Rolle (ELLINGTON et al., 2017; QUAINOO et al., 2017; BHARAT et al., 2022). Aus diesen Gründen sollte die Resistenzdiagnostik nicht ausschließlich *in silico* durchgeführt werden (BHARAT et al., 2022). Denkbar wäre ein *in vitro*-Screening eines bestimmten Prozentsatzes der *S. Dublin* Isolate in Deutschland ergänzend zu einer standardmäßigen *in silico*-Bestimmung.

### **3. Epidemiologische Untersuchungen**

Die Epidemiologie beschäftigt sich mit den zu einem Krankheitsausbruch führenden Wechselwirkungen zwischen Krankheitserreger, Wirt und Umwelt. Nicht nur die Pathogenese und das Einzeltier, sondern auch der Betrieb, die Region, das Land und Umweltfaktoren werden in Untersuchungen mit einbezogen. In der vorliegenden Studie war das Ziel der epidemiologischen Untersuchungen, das Risiko einer *S. Dublin* Infektion, das Ausmaß und die Folgen für einen Bestand abzuschätzen, geeignete Bekämpfungs- und Biosicherheitsmaßnahmen auszuwählen und den Erreger zur Prävention erneuter Infektionen zu überwachen (SERGEANT & PERKINS, 2015; KLOSE et al., 2022).

#### **3.1. Verfahren der epidemiologischen Untersuchungen**

Seit dem 01. Januar 1995 werden amtlich festgestellte Rindersalmonellose-Ausbrüche über das Nationale Tierseuchennachrichtensystem (TSN) erfasst (METHNER, 2012; FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2022). Einen jährlichen Überblick liefert der Tiergesundheitsjahresbericht des Friedrich-Loeffler-Institutes (METHNER, 2021). Über das Herkunfts-Informationssystem können auf Betriebsebene die Bewegungen von Einzeltieren per Ohrmarkenabgleich nachverfolgt werden (BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 2021). In Kombination mit dem TSN können so *S. Dublin* Übertragungen zwischen Betrieben nachverfolgt werden.

Gemäß der Rinder-Salmonellose-Verordnung müssen in Deutschland in betroffenen Betrieben potentielle Eintragsquellen von Salmonellen überprüft werden (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ, 1991; DIRKSEN, 2002; METHNER, 2012). Bei *S. Dublin* liegt aufgrund des Hauptübertragungswegs durch Kot der

Schwerpunkt auf zugekauften Tieren oder Tieren aus anderen Teilbetrieben (DIRKSEN, 2002; NIELSEN et al., 2013). Aber auch Personen und Fahrzeuge mit Kontakt zu anderen Beständen, Schadnager, Wildvögel, Futtermittel, kontaminierte Weideflächen und Wasserläufe sind mögliche Eintragsquellen für Salmonellen (FIELD, 1948; NAZER & OSBORNE, 1977; DIRKSEN, 2002; METHNER, 2012).

Auf Erregerebene bietet die Verwandtschaftsanalyse anhand der Daten der Vollgenomsequenzierung eine gute Möglichkeit Übertragungen von *S. Dublin* innerhalb und zwischen verschiedenen Betrieben nachzuweisen (AGREN et al., 2016; GARCIA-SOTO et al., 2021).

### **3.2. Auswertung mit dem Schwerpunkt Almweiden**

Bei der Auswertung der epidemiologischen Daten muss unterschieden werden zwischen gut abgrenzbaren Ausbruchsgeschehen und endemischen Geschehen, die über einen längeren Zeitraum stattfinden. Diese sind in der Regel schwieriger zu untersuchen, da vielfältige Infektionswege schwer überschaubar und teilweise nicht mehr nachvollziehbar sind.

Geografisch gut abgegrenzte Ausbruchsgeschehen zeigen sowohl in der epidemiologischen Untersuchung als auch bei den Ergebnissen der Vollgenomsequenzierung einheitliche Ergebnisse (AGREN et al., 2016). Beim Vergleich von *S. Dublin* aus verschiedenen Bundesländern können die Isolate unterschiedlicher Herkunft gut voneinander unterschieden werden (GARCIA-SOTO et al., 2021).

Für endemische Gebiete, wie zum Beispiel Oberbayern, ist eine Nachverfolgung rein auf der Basis epidemiologischer Daten jedoch schwierig. Das endemische Geschehen ist über Jahre oder sogar Jahrzehnte regional etabliert und ein möglicher Ursprung zu einem späteren Zeitpunkt oft nicht mehr eindeutig nachvollziehbar. In der vorliegenden Studie haben aktiv ausscheidende Tiere auf Almweiden viele Kontakttiere aus unterschiedlichen Betrieben, Kontakt zu wildlebenden Tieren oder auch belebten und unbelebten Vektoren (KLOSE et al., 2022). Rinder, die sich auf Almen infizieren, können als latente Träger in ihren Herkunftsbetrieb zurückkehren und dort weitere Tiere infizieren (ALLERBERGER et

al., 2003; BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 2010; KLOSE et al., 2022). Eine mögliche Vorgehensweise für diese Problematik wäre der Ansatz von de Knecht. Epidemiologische Gruppen werden nicht nur auf Herden beschränkt, sondern weiter gefasst, zum Beispiel Betriebe mit benachbarten Weiden oder Betriebe, die Tiere austauschen (DE KNEGT et al., 2020). In Bayern würden dementsprechend Almen und die Ursprungsbetriebe der dort gehaltenen Tiere eine epidemiologische Einheit bilden.

#### **4. Vollgenomanalyse**

Die Vollgenomanalyse ist die derzeit vollumfänglichste Methode zur molekularen Charakterisierung von Mikroorganismen und kann folgende Fragestellungen bedienen:

- Genotypisierung mit forensisch belastbarer Identifizierung einzelner Organismen
- Phylogenetische Berechnungen mehrerer ähnlicher Organismen, Verwandtschaftsanalyse
- Anzahl und Qualität von codierenden Genen beispielsweise für Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenz, Toxine und Oberflächenantigene

In den letzten Jahren ist diese Methode zugänglicher und kostengünstiger für Anwenderlabore geworden und ist demzufolge nicht mehr ausschließlich in der Forschung angesiedelt (QUAINOO et al., 2017).

Vor knapp 25 Jahren wurde mittels der ersten Generation der Sequenzieretechniken von Fleischmann et al. das erste vollständig sequenzierte bakterielle Genom beschrieben. Die dafür verwendete Technik war eine modifizierte und automatisierte Version der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (SANGER et al., 1977; FLEISCHMANN et al., 1995). Die zweite und dritte Generation der Sequenzieretechniken liefern in kürzerer Zeit größere Mengen an Daten und sind kostengünstiger (STRANNEHEIM & LUNDEBERG, 2012; LAND et al., 2015; QUAINOO et al., 2017).

Eine spezielle Anwendung findet die Vollgenomsequenzierung von Salmonellen bei der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen.

Das Genom von Salmonellen besteht aus 4,3 bis 5 Millionen Basenpaaren (SELBITZ et al., 2015). Zum aktuellen Zeitpunkt sind im Europäischen Nukleotid-Archiv (ENA) über 2.100 assemblierte Genome von *S. Dublin* veröffentlicht (ENA, 2022b).

#### **4.1. Verfahren der Vollgenomsequenzierung**

Aktuell sind drei Technologien von jeweils unterschiedlichen Anbietern marktführend. Die Illumina Technologie gehört zur zweiten Generation der Sequenzier-Techniken, bei der short reads (kurze Teilsequenzen bis zu einer Länge von 300 Basenpaaren) generiert werden. Bei der Entschlüsselung komplexer Regionen insbesondere von bisher unbekanntem Regionen des Genoms stößt diese Technologie allerdings an ihre Grenzen. Pacific Biosciences und Oxford Nanopore Technologies gehören zur dritten Generation, bei der keine Amplifizierung nötig ist und long reads (lange zusammenhängende Teilsequenzen über 10.000 Basenpaare) generiert werden (QUAINOO et al., 2017).

##### **4.1.1. Illumina Sequenziermethode**

Geräte von Illumina messen mit dem Prinzip des Sequencing by Synthesis, also die Sequenzierung während der Synthese des Komplementärstranges. Für die Synthese des Komplementärstranges werden fluoreszenzmarkierte Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) eingesetzt, die während der Inkorporierung in den neuen Strang ein Fluoreszenzsignal abgeben.

Zunächst wird die DNA eines Isolates enzymatisch oder mittels Ultraschall fragmentiert. An die Enden der Fragmente werden Adaptersequenzen ligiert, die mit einem für das Isolat eigens zugeordnetem Barcode versehen sind. Alle zu untersuchenden Libraries werden zu einem Pool zusammengefasst, der in ein Sequenzier-Reaktionsgefäß gegeben wird. Dieses enthält zusätzlich alle Reagenzien, die während eines Sequenzierlaufes benötigt werden.

Das Sequenziergerät lädt den Kartuscheninhalt auf eine sogenannte Flow Cell. Dies ist ein Chip, der mit den Komplementärsequenzen der Adaptersequenzen beschichtet ist. Die Adaptersequenzen und damit die DNA-Fragmente binden so

an einem vorgesehenen Ort auf der Oberfläche der Flow Cell. Die DNA-Fragmente werden durch eine DNA-Polymerase mehrfach amplifiziert, wodurch Ballungszentren aus Einzelsträngen, sogenannte Cluster, entstehen.

Danach werden die dNTPS, also vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Nukleotide (A, C, G und T) über die Flow Cell geschwemmt und durch eine Polymerase einzeln in den neuen DNA-Strang inkorporiert. Nach einem Waschschrift wird die Fluoreszenz gemessen. Anschließend wird der Fluoreszenzmarker abgespalten, fortgespült und der Prozess wiederholt. Mittels der für jedes Nukleotid unterschiedlichen Fluoreszenzsignale wird die Basenfolge jedes Clusters dokumentiert und daraus die genetische Sequenz konstruiert.

Die Fehlerquote bei der Zuweisung der passenden Base zum Fluoreszenzsignal wird bei Illumina mit dem Qualitätsfaktor von 30 ( $Q_{30}$ ) angegeben. Dieser sagt einen Fehler von einer falsch zugewiesenen Base unter 1.000 voraus. Der  $Q_{30}$  ist abhängig vom verwendeten Illumina-Gerät. Laut Herstellerangaben liegt die Fehlerquote für das bei unseren Untersuchungen verwendete Gerät MiniSeq bei 0,1 % bei > 80 % der zugewiesenen Basen. Dieser Wert ist vergleichsweise niedrig und die Illumina Methode daher eine sehr zuverlässige Methode (QUAINOO et al., 2017).

#### **4.1.2. Pacific Biosciences**

Die Technologie und das Patent der amerikanischen Firma Pacific Biosciences (PacBio) basiert auf Single-Molecule Real-Time (SMRT) Sequenzierung. Im ersten Schritt der SMRT Technologie muss die sogenannte SMRT bell generiert werden, indem beide Enden eines doppelsträngigen DNA-Moleküls mit Haarnadel-Adaptoren ligiert werden. Die SMRT bell wird in eine SMRT cell gegeben. Dies ist ein Chip, der mikroskopisch kleine Kammern enthält. Am Boden dieser Kammern befindet sich eine immobilisierte DNA-Polymerase, an die der Haarnadel-Adapter bindet. In jeder Kammer wird nur ein einziges DNA-Molekül sequenziert. Im nächsten Schritt werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide (A, C, G und T) über die SMRT cell geschwemmt. Die Polymerase inkorporiert die markierten Nukleotide. Dabei werden die Fluoreszenzmarker abgespalten und emittieren ein pulsartiges Lichtsignal, das spezifisch für jede Base ist. Mit einem Laserstrahl werden diese

Lichtsignale detektiert und in Echtzeit aufgenommen. Auf diesem Weg werden die inkorporierten Basen und somit die Basenabfolge der untersuchten DNA als kontinuierlicher long read bestimmt.

Mit der PacBio Technologie können im Vergleich zum Illumina Patent zwar verhältnismäßig weniger Isolate während eines Durchgangs untersucht werden, aber die Sequenzierung per PacBio ist deutlich schneller.

Die Fehlerquote liegt mit 14 % pro Base relativ hoch. Das ist dadurch bedingt, dass Nukleotide, die für längere Zeit in der Kammer verweilen ohne durch die Polymerase in den Strang inkorporiert zu werden, mitgemessen werden können (QUAINOO et al., 2017).

#### **4.1.3. Oxford Nanopore Technologies**

Die Technologie der britischen Oxford Nanopore Technik basiert auf einzelnen Protein-Nanoporen, deren Öffnung durch elektrischen Strom katalysiert wird. Die Nanopore ist in einer Polymermembran eingebettet, die elektrisch resistent ist. Komplexe aus DNA-Strängen und prozessiven Enzymen werden über die Membran geleitet und binden an die Nanopore. Einzelne DNA-Moleküle passieren die Nanopore und führen dabei zu Spannungsänderungen. Unterschiedliche Spannungsänderungen können den einzelnen Nukleotiden zugeordnet werden.

Sobald ein Haarnadel-Adapter an die gegenüberliegenden Enden eines DNA-Stranges ligiert wird, können beide Stränge in einem Durchgang gelesen und damit die Sequenzabfolge ausgewertet werden. Im Gegensatz zu den anderen hier aufgeführten Technologien erfolgt die Übermittlung der Ergebnisse in Echtzeit. Es handelt sich um die bisher schnellste kommerziell verfügbare Methode.

Diese vergleichsweise neue Technologie der Sequenzierung ist noch nicht vollständig ausgereift und hat mit 15 % pro Base die höchste Fehlerquote der hier aufgeführten Technologien (QUAINOO et al., 2017).

## 4.2. Datenbanken für Salmonellen

### 4.2.1. Datenbanken für Nukleotidsequenzen

Die Internationale Nukleotid Sequenz Datenbank Kollaboration (INSDC) ist ein Zusammenschluss aus den drei größten und öffentlich zugänglichen internationalen Datenbanken für Nukleinsäuresequenzen, bestehend aus der US-amerikanischen, der japanischen und der europäischen Datenbank (INSDC, 2022).

Die US-amerikanische Datenbank wird verwaltet durch das Nationale Zentrum für Biotechnologieinformation (NCBI). Es ist Teil des US-amerikanischen Gesundheitsministeriums. NCBI ist Kurator einer Datenbank für öffentlich zugängliche DNA-Sequenzen, der GenBank (NCBI, 2022).

Die japanische Datenbank (DDBJ) ist dem japanischen Ministerium für Bildung, Kultur, Sport, Wissenschaft und Technologie angeschlossen (DDBJ, 2022; OKIDO et al., 2022).

Das Europäische Nukleotid-Archiv (ENA) wird in Großbritannien verwaltet (ENA, 2022a).

Alle drei Datenbanken sind Plattformen zum öffentlichen Austausch von Sequenzierdaten und stellen zudem zahlreiche Werkzeuge zur Analyse der Daten zur Verfügung.

Die britische Plattform EnteroBase ist webbasiert und ermöglicht die Assemblierung von Illumina short reads und die Analyse und Darstellung der Verwandtschaft auf verschiedenen Wegen (ALIKHAN et al., 2018; WARWICK MEDICAL SCHOOL, 2022).

### 4.2.2. Identifizierung von Serovaren nach Vollgenomsequenzierung

Software, wie beispielsweise SeqSero bestimmt aus Sequenzierdaten den Serotyp von Bakterien wie Salmonellen. Zur Verfügung gestellt wird diese webbasierte Anwendung seit 2015 von der Technischen Universität Dänemark (DTU) (DTU, 2021). Basierend auf Datenbanken bereits identifizierter *Salmonella* Serotypen gleicht die Methode Determinanten spezifischer Gene, hier rfb gen Cluster, *fliC*

und *fljB* Allele, mit der unbekanntem Sequenz ab. Die Bestimmung eines genom-basierten Serotyps erfolgt innerhalb weniger Minuten für über 2.300 Serotypen (ZHANG et al., 2015). SeqSero 2.0 ist die aktuelle, verbesserte und bisher schnellste Version (ZHANG et al., 2019). In einer Studie mit 1.041 Isolaten konnte bei 86,4 % die Serovar mittels SeqSero zugeordnet werden. Die übrigen Isolate konnten ausschließlich aufgrund fehlender Abdeckung durch die Datenbank nicht bestimmt werden. Die Autoren der Studie setzen SeqSero in ihrem Labor bereits in der Routinediagnostik ein (IBRAHIM & MORIN, 2018). S. Dublin wird durch die Datenbank abgedeckt und kann deshalb mit SeqSero sicher bestimmt werden.

#### **4.2.3. Identifizierung von Virulenzgenen**

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Virulenzfaktoren bei Mikroorganismen stellt die „Virulenzfaktor Datenbank“ (VFDB) des Institute of Pathogen Biology in Peking, China dar. Die Datenbank enthält Allele von ausgewählten pathogenen Bakterienspezies, die mit Virulenzfaktoren assoziiert sind. Darunter befinden sich zahlreiche Einträge für *Salmonella enterica* (INSTITUTE OF PATHOGEN BIOLOGY, 2021).

Ein weiteres Software Programm, zur Detektion von Plasmiden in Sequenzierdaten ist der „PlasmidFinder“, ebenfalls eine Anwendung der DTU (DTU, 2022b). Plasmide stellen zusätzliches Genmaterial für Bakterien, meist für Überlebensstrategien der Prokaryonten, zur Verfügung. Jedoch sind auch zahlreiche Virulenzgene oder Gene für antimikrobielle Resistenz beschrieben, die durch sogenannte Virulenzplasmide die Pathogenität eines Bakteriums steigern können (PILLA & TANG, 2018).

#### **4.2.4. Identifizierung von antimikrobiellen Resistenzgenen**

Eine mögliche webbasierte Anwendung zur Identifizierung von antimikrobiellen Resistenzgenen ist der in Dänemark entwickelte „ResFinder“ (DTU, 2022a). Die Plattform wird seit 2012 zur Verfügung gestellt von der DTU, gleichzeitig Kooperationszentrum der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für antimikrobielle Resistenzen. Die Plattform ermöglicht die Überwachung und Forschung an der Resistenzentwicklung (FLORENSA et al., 2022).



Weitere ähnliche Werkzeuge beinhaltet der Resistance Gene Identifier (RGI) auf Basis der Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), zur Verfügung gestellt von der McMaster Universität in Ontario, Kanada. Die Besonderheit dieser Datenbank ist, dass auch Mutationen, die in Zusammenhang mit antimikrobiellen Resistenzen stehen, identifiziert werden können (ALCOCK et al., 2020). Im Gegensatz zu ResFinder findet die Analyse anhand von Proteinsequenzen statt (QUAINOO et al., 2017).

### **4.3. Datenauswertung**

Die im Sequenzierprozess generierten Rohdaten müssen zunächst aufbereitet werden. Das sogenannte Trimming (Abtrennen der Adapter an den Endstücken der Reads) erfolgt bei Illumina bereits durch die Software des Sequenziergerätes. Danach folgt die sogenannte Assemblierung, die Zusammensetzung der einzelnen Reads zu einem DNA-Strang. Diese wird in der Regel durch einen Abgleich mit einem Referenzstrang durchgeführt. Sobald die untersuchten Isolate in assemblierter Form vorliegen können zum Beispiel die Bestimmung der Spezies und Serovare oder Verwandtschaftsanalysen durchgeführt werden.

Die hier aufgeführten Software Programme und Analysemethoden sind ein Auszug aus den zahlreichen verfügbaren Werkzeugen. Die hier aufgeführten Beispiele sind geeignet für Anwender mit wenig bioinformatischen Kenntnissen und ohne Zugang zu Linux oder Unix Rechnern.

#### **4.3.1. Software**

Voraussetzungen für die Nutzung von Software ist ein leistungsstarker Rechner. Kommerziell erhältliche Software Programme zeichnen sich durch ihre grafische Nutzeroberfläche aus. Aus diesem Grund kann ein Anwender mit wenig bis keinen bioinformatischen Kenntnissen die Analysen durchführen (QUAINOO et al., 2017).

Die Firma Ridom aus Münster vertreibt SeqSphere+, eine Software zur Auswertung von Sequenzierdaten. Mit dieser Software können die Daten automatisiert analysiert werden. Die Anwendungen der Software reichen von der Assemblierung der Rohdaten über die Speziesbestimmung bis zur visuellen Darstellung von Genomvergleichen, beispielweise dem core genome multilocus sequence typing (cgMLST). Weiterhin ist ein Vergleich der Genome von

verschiedenen Isolaten durch die Darstellung in einem Dendrogramm, hier minimum spanning tree, möglich (RIDOM BIOINFORMATICS, 2022).

Die Software Bionumerics der Firma Biomérieux dient ebenfalls der Auswertung von Sequenzierdaten. Die angebotenen Analysewerkzeuge sind in Module aufgeteilt, die einzeln erworben werden können. Je nach Modul können Speziesbestimmung, Vollgenom Single Nucleotide Polymorphism (wgSNP)- und Vollgenom Multilocus Sequence Typing (wgMLST)-Analysen durchgeführt werden (QUAINOO et al., 2017).

#### **4.3.2. Analysemethoden**

Die Bioinformatik stellt vielfältige Analysemethoden von Genomsequenzen zur Verfügung. Das klassische Multilocus Sequence Typing (MLST) ist eine molekulare Charakterisierung eines Isolates und seit langer Zeit etabliert, weshalb Daten aus älteren Publikationen mit neuen Daten verglichen werden können. Weltweit wird bei *S. Dublin* am häufigsten der MLST Sequenztyp 10 (ST10) nachgewiesen (GARCIA-SOTO et al., 2021; SREDNIK et al., 2021).

Die core genome MLST (cgMLST) ist eine Weiterentwicklung der MLST. Statt einzelner konservierter Housekeeping Gene werden bei dieser Variante tausende miteinander verglichen. Dadurch ist eine deutlich höhere Auflösung der Charakterisierung möglich und die Ergebnisse der Analyse sind zuverlässiger. Zusammengehörige Isolate, beispielsweise diejenigen eines Ausbruchs, werden einem Cluster Type (CT) zugeordnet. Die einheitliche Bezeichnung der CTs erlaubt einen Vergleich mit Daten anderer Ausbruchsuntersuchungen (QUAINOO et al., 2017).

Mit der Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Analyse werden zusätzlich intergene Regionen einbezogen. Diese Analyse bietet aktuell die höchste Trennschärfe der Sequenzanalyse (QUAINOO et al., 2017). Die SNP-Analyse kann entweder im Vergleich mit einem Referenzgenom durchgeführt werden, oder auch ohne Referenzgenom, dann aber innerhalb einer Gruppe von sequenzierten Isolaten.

Die Pangenomanalyse vergleicht sowohl Kerngene, sogenannte core Gene, als auch akzessorische Gene von Isolaten. Core Gene sind in allen zu vergleichenden

Isolaten enthalten, während akzessorische Gene ggf. nur in manchen vorhanden sein können. Diese Methode erfordert sehr viel Rechenleistung, weshalb sie für einfache Ausbruchsgeschehen nicht angewendet wird (QUAINOO et al., 2017).

Ähnlich wie bei der Pangenomanalyse, werden bei der Vollgenom MLST (wgMLST) core und akzessorische Gene bzw. Loci detektiert. Hierdurch ist die Auflösung der Ergebnisse noch höher als bei der cgMLST. Jedoch bietet diese Methode keine vereinheitlichte Nomenklatur und kann nur in einem geschlossenen Projekt angewendet werden. Die Einbeziehung anderer Daten, die beispielsweise bereits publiziert wurden, ist daher nicht möglich (QUAINOO et al., 2017). Zusammenfassend gilt, dass für die Vollgenomanalyse mehrere verschiedene Methoden miteinander kombiniert werden können, um die erwähnten Vorteile jeder einzelnen Methode zu nutzen und deren Nachteile auszugleichen.

#### **4.3.3. Epidemiologische Untersuchungen und deren Einbeziehung in Laborergebnisse**

Die aufgeführten molekularbiologischen Methoden eignen sich zur Verwandtschaftsanalyse von Bakterienisolaten, insbesondere den hier untersuchten *S. Dublin* Stämmen. Aus früheren Studien geht hervor, dass einzelne *S. Dublin* Cluster innerhalb Deutschlands auf eine Region beschränkt sind. Obwohl einerseits das einmalige Vorkommen eines Clusters beschrieben wurde, gibt es auch andere Cluster, die über ganz Deutschland verteilt sind (GARCIA-SOTO et al., 2021). Wenn man diese verteilten Isolate in einen epidemiologischen Zusammenhang mit Tierbewegungen bringen kann, dann lässt sich eine Übertragung des Erregers, beispielsweise durch Handel von Tieren entsprechend nachweisen.

Zusätzlich kann die zeitbedingte Veränderung eines herdenspezifischen *S. Dublin* Stammes nachverfolgt werden, wenn epidemiologische Daten vorliegen. Isolate aus Rinderherden, die kontinuierlich beprobt wurden, zeigen einen Unterschied von weniger als 10 SNPs untereinander. Falls ein zeitlicher Abstand von mehreren Jahren zwischen der Beprobung einer Rinderherde existierte, zählen Isolate mit bis zu 14 SNPs Differenz als verwandt. Besteht ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Rinderherden, so können Isolate mit Unterschieden bis

zu 15 SNPs verwandt sein (DE KNEGT et al., 2020; KUDIRKIENE et al., 2020).

#### **4.4. Ausblick auf die Vollgenomanalyse von Salmonellen**

Die Vollgenomanalyse ist laut Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) eine der bedeutendsten Methoden im Bereich der Mikrobiologie geworden. Im Vergleich zu der klassischen Diagnostik bietet die Vollgenomsequenzierung umfangreichere und hochauflösende Ergebnisse und kann nachfolgende etablierte Methoden ersetzen (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS et al., 2019; BFR, 2020).

Die zuverlässige Vorhersage der Serovar mittels Vollgenomsequenzierung wird nicht durch unspezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen verfälscht. Demnach sollten laut BfR genotypische Daten zu Serotypen in das White-Kauffmann-Le Minor-Schema integriert werden und dieses in Zukunft ersetzen (BFR, 2020).

Gene, die Pathogenitätsfaktoren bestimmen, wie zum Beispiel Biofilmbildung und Unempfindlichkeit gegenüber bestimmten Desinfektionsmitteln, können mittels Vollgenomsequenzierung direkt detektiert werden (BFR, 2020).

Durch die Untersuchung auf Antibiotikaresistenzgene im Genom wird sichergestellt, dass nicht nur exprimierte Gene nachgewiesen werden, wie es bei der phänotypischen Resistenzbestimmung der Fall ist. Zusätzlich werden auch nicht exprimierte Genabschnitte detektiert, die wie im Falle von Plasmiden zudem auf andere Bakterien übertragen werden könnten (BFR, 2020).

Im Fall der Rindersalmonellose kann durch den Einsatz der Vollgenomsequenzierung in Kombination mit epidemiologischen Untersuchungen möglicherweise die Infektkette unterbrochen und die Übertragung auf den Menschen begrenzt werden. Durch den prophylaktischen Schutz anderer Herden werden in solch einem Fall Tiergesundheit und Tierwohl gefördert (BFR, 2020).

Zusammenfassend bietet die Vollgenomsequenzierung mehr und schnellere diagnostische Möglichkeiten und wird die konventionellen Methoden in Zukunft ersetzen (LAND et al., 2015; BFR, 2020).



### III. PUBLIKATION

#### **Titel**

Whole Genome Investigation of *Salmonella* Dublin Considering Mountain Pastures as Reservoirs in Southern Bavaria, Germany

#### **Autoren**

Corinna Klose, Nelly Scuda, Tobias Ziegler, David Eisenberger  
Matthias Hanczaruk und Julia M. Riehm

#### **Journal**

Microorganisms (IF 2021: 4.926)

#### **Status**

akzeptiert am 21.04.2022

publiziert online am 23.04.2022


Microorganisms 10 (2022) 885

doi: [10.3390/microorganisms10050885](https://doi.org/10.3390/microorganisms10050885)



Article

# Whole-Genome Investigation of *Salmonella* Dublin Considering Mountain Pastures as Reservoirs in Southern Bavaria, Germany

Corinna Klose <sup>1</sup>, Nelly Scuda <sup>1</sup>, Tobias Ziegler <sup>1</sup>, David Eisenberger <sup>1</sup>, Matthias Hanczaruk <sup>2</sup> and Julia M. Riehm <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Bavarian Health and Food Safety Authority, Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen, Germany; corinna.klose@lgl.bayern.de (C.K.); nelly.scuda@lgl.bayern.de (N.S.); tobias.ziegler@lgl.bayern.de (T.Z.); david.eisenberger@lgl.bayern.de (D.E.)

<sup>2</sup> Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinärstrasse 2, 85764 Oberschleißheim, Germany; matthias.hanczaruk@lgl.bayern.de

\* Correspondence: julia.riehm@lgl.bayern.de

**Abstract:** Worldwide, *Salmonella* Dublin (*S. Dublin*) is responsible for clinical disease in cattle and also in humans. In Southern Bavaria, Germany, the serovar was identified as a causative agent for 54 animal disease outbreaks in herds between 2017 and 2021. Most of these emerged from cattle herds ( $n = 50$ ). Two occurred in pig farms and two in bovine herds other than cattle. Genomic analysis of 88 *S. Dublin* strains isolated during these animal disease outbreaks revealed 7 clusters with 3 different MLST-based sequence types and 16 subordinate cgMLST-based complex types. Antimicrobial susceptibility investigation revealed one resistant and three intermediate strains. Furthermore, only a few genes coding for bacterial virulence were found among the isolates. Genome analysis enables pathogen identification and antimicrobial susceptibility, serotyping, phylogeny, and follow-up traceback analysis. Mountain pastures turned out to be the most likely locations for transmission between cattle of different herd origins, as indicated by epidemiological data and genomic traceback analyses. In this context, *S. Dublin* shedding was also detected in asymptomatic herding dogs. Due to the high prevalence of *S. Dublin* in Upper Bavaria over the years, we suggest referring to this administrative region as “endemic”. Consequently, cattle should be screened for salmonellosis before and after mountain pasturing.

**Keywords:** *Salmonella* Dublin; mountain pasture; whole-genome sequencing; genome analysis; antimicrobial resistance; virulence; cattle



**Citation:** Klose, C.; Scuda, N.; Ziegler, T.; Eisenberger, D.; Hanczaruk, M.; Riehm, J.M. Whole-Genome Investigation of *Salmonella* Dublin Considering Mountain Pastures as Reservoirs in Southern Bavaria, Germany. *Microorganisms* **2022**, *10*, 885. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050885>

Academic Editors: Chao-Nan Lin and Peck Tong Ooi

Received: 17 March 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 23 April 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

More than 2600 serovars are known in the genus of *Salmonella* [1]. Most of them are pathogenic for humans and animals belonging to the zoological classes of mammals, birds, and reptiles [2–4]. Animals are known to represent reservoirs for these Enterobacteriaceae; however, environmental or inanimate vehicles can also be part of the transmission chain [5–7]. Strong characteristics regarding *Salmonella* infection and the respective clinical picture for the serovar Dublin are still carrying and subclinical shedding [8–10]. The carrier state may persist for several years. Intermittently triggered shedding may lead to broad spreading of the pathogen on pastures [9]. When taking into account that *Salmonella* can survive in nonhost environments for months, infection of herbivores grazing on pastures is likely, thus possibly completing a transmission cycle [9,11]. According to one study published in Austria, cattle probably acquired salmonellosis by grazing on contaminated alpine pastures [12]. The *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) is primarily adapted to cattle. The most frequently described clinical manifestations are abortions in cows, whereas acute systemic disease and diarrhea are predominant in calves [9,13].

In the rare case of zoonosis, however, *S. Dublin* can cause invasive infection with high mortality rates [14–17]. As published, *S. Dublin* is the most common serotype that causes systemic salmonellosis in humans (61%) in the United States, and the proportion of resistant isolates is higher than among other serotypes [18,19]. In addition to antimicrobial resistance, *S. Dublin* may harbor virulence factors that contribute to the pathogenicity of the respective isolates [20]. Globally, this pathogen is considered a public health threat [18,21]. In Germany, *S. Dublin* caused 30–45% of all salmonellosis outbreaks in cattle herds in the years 2017–2019 [22,23]. Federal public health departments reported 25 cases of human infection with *S. Dublin* in Germany during the period of our study from 2017 to 2021, of which four cases occurred in Bavaria [24].

As a consequence, and in line with One Health, *Salmonella* outbreaks among humans and animals as well as incidences regarding food and feed are strictly monitored in Europe. In Germany, legislated *Salmonella* control in cattle was initiated in the 1970s [25]. In all of Europe, the registration and subsequent assignment of a unique identification number to each individual cow is mandatory to ensure traceback options. If *Salmonella* is detected in cattle, local veterinary authorities have to place the herds under restriction, initiate remedial measures, and conduct an epidemiological investigation. The source of infection, however, often remains unknown [26]. Mountain pastures offer a challenge in epidemiological investigations. For a limited time during the summer months and the associated geographic relocation of animals to mountain pastures, the ownership of cattle is temporarily transferred to the proprietor of the pasture. Therefore, several owners must be considered. Investigations including whole-genome analysis may provide valuable clues as to transmission routes in these circumstances.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *Salmonella* Isolates

In the present study, the definition of a *Salmonella* animal disease outbreak was the detection of the bacterium in one or more animals on a specific farm during the following calendar year. For the special situation of a mountain pasture, the demarcation of an outbreak was defined by the designated pasture grounds, where animals from different farms stayed in close contact during the summer months.

As regulated by German law, all Bavarian cattle farms associated with *Salmonella* outbreaks were exclusively investigated cost-free at the federal state veterinary laboratories of the Bavarian Health and Food Safety Authority to ensure transparency. In the present study, sample types included feces, fecal swabs or tissue from cattle, bovines other than cattle, pigs, and herding dogs in Southern Bavaria. The diagnostic algorithm for *Salmonella* was applied according to standardized methods, including the ISO Standard 6579-1:2020-08 [27]. Suspicious colonies were identified using MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker, Bremen, Germany). All *Salmonella* isolates were serotyped pursuant to the White–Kauffmann–Le Minor scheme by using poly- and monovalent anti-O and anti-H sera (Sifin, Berlin, Germany) [28]. The isolates were preserved at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  by the Bavarian Health and Food Safety Authority.

In the 5-year period of 2017–2021, *S. Dublin* index isolates originating from 54 individual animal disease outbreaks were included in the study. In a further approach, 3 isolates recovered from a mountain pasture outbreak at Miesbach in 2020 and 28 isolates obtained from a single outbreak in the summer of 2021 on a mountain pasture in Garmisch-Partenkirchen were investigated more profoundly. To address other questions, such as transmission between different animal species on farms or the genomic changes of the bacterium in hosts over time, additional isolates collected from the animal disease outbreaks were included. A total of 88 *S. Dublin* isolates were investigated in the present study.

Two of the investigated isolates (54 and 57) have previously been analyzed, and the results were published in a nationwide study by the Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich-Loeffler-Institute, Jena, Germany [29].



2.2. Epidemiological Analysis

Subsequent to the isolation of *Salmonella*, additional contact animals were investigated during an epidemiological analysis. Data on herd identity, ownership, cattle trade, date of death or slaughter, and geographical location of the individual animals were obtained from the national Animal Traceability Information Management System [30] and used for the epidemiological analysis in the present study. For the epidemiological analysis in the present study, the previous owner, the pasture proprietor, and the owner of the specific animal after the pasturing period were determined. Finally, upon considering all involved geographic locations, all data were compiled up to the *Salmonella* isolation date. The clustering of isolates based on whole-genome analysis was matched to owners, geographic locations, and respective years to identify individual animals or geographic locations as possible outbreak origins. The federal Animal Disease Information System [31] consistently collects data on all contagious animal diseases, mandatorily reported by the local authorities, as a direct information platform for the federal Ministry of Food and Agriculture. This source was used to verify the results obtained in the epidemiological analysis.

2.3. Antimicrobial Susceptibility Testing

In vitro antimicrobial susceptibility testing was conducted on 71 isolates, whereby 1 isolate of each animal host species per outbreak was included. In the Garmisch-Partenkirchen mountain pasture instance, 1 isolate per originating farm and cluster was investigated. Nine antimicrobial substances from six classes were tested (Figure 1) using the microbroth dilution method in accordance with the manufacturer’s instructions (Micronaut-S MDR MRGN-Screening and Micronaut-S Grosstiere 4, Merlin, Bornheim, Germany). The minimum inhibitory concentration was determined using a photometric plate reader system (Tecan, Männedorf, Switzerland) and MCN6 software (Sifin, Bruker, Bornheim, Germany) pursuant to the protocols of the Clinical and Laboratory Standards Institute Vet01S, 5th ed. (CLSI, Wayne, PA, USA) [32]. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain for quality control purposes. Antimicrobial susceptibility results were interpreted according to CLSI breakpoints of numerical MIC values, which were established for specific host–pathogen–drug combinations. In application of these breakpoints, the results were categorized as susceptible, intermediate, or resistant phenotypes for each specific substance.

Antimicrobial class	Substance	MIC values (µg/mL)											S	I	R
		0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128			
Aminoglycosides	Gentamicin	8	33	20	9	0	1	0	0				71	0	0
β-Lactams	Amoxicillin–clavulanate <sup>1</sup>					71	0	0	0				71	0	0
	Ampicillin		10	56	5	0	0	0	0				71	0	0
	Meropenem	70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	0	0
Chloramphenicols	Chloramphenicol							68	3				68	3	0
Quinolones	Ciprofloxacin		71	0	0	0							71	0	0
	Levofloxacin			71	0	0							71	0	0
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim–sulfamethoxazole <sup>2</sup>				71	0	0						71	0	0
Tetracyclines	Tetracycline	0	0	20	49	1	0	0	1				70	0	1

Figure 1. Antimicrobial susceptibility testing for *Salmonella* Dublin isolated from bovines, pigs, and dogs was carried out on nine substances from six antimicrobial classes. Red lines delineate the breakpoints towards resistant (R), and green lines delineate the breakpoints towards intermediate (I) minimum inhibitory concentration (MIC). Yellow boxes indicate the only intermediate and resistant isolates found in this study. Most of the isolates were completely susceptible (S). <sup>1</sup> Concentration of amoxicillin is reflected, concentration ratio of amoxicillin–clavulanate: 2:1. <sup>2</sup> Concentration of trimethoprim is reflected, concentration ratio of trimethoprim–sulfamethoxazole: 1:19.

#### 2.4. Whole-Genome Sequencing

To implement whole-genome sequencing, a single colony of an overnight blood agar plate culture at 37 °C was used for genomic DNA extraction, applying a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Purified DNA was quantified using a Qubit 4.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) via a Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Waltham, MA, USA). Library preparation was performed using a Nextera XT DNA Library Prep Kit and Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Libraries were quantified using an Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on a 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Subsequently, 2 × 150 bp paired-end reads were generated on an Illumina MiniSeq system, and sequenced reads with a mean assembled coverage depth of 98× (range 37–176×) were analyzed.

#### 2.5. Genetic Characterization

Verification of the *Salmonella enterica* subspecies *enterica* and in silico serotype prediction were carried out using Mash distance implemented in SeqSphere + software version 7.0.2 (Ridom GmbH, Münster, Germany) and the SeqSero 1.2 online tool [33,34]. Furthermore, screening of genetic elements coding for antimicrobial resistance was performed by applying the publicly available database ResFinder 4.1 with an ID threshold of 90% and a minimum length of 60% [35]. Moreover, the virulence factor database (VFDB) was used to screen for putative virulence factors with an ID threshold of 85% and a minimum length of 60% [36]. Plasmid replicons were identified by PlasmidFinder 2.1 with an ID threshold of 95% and a minimum length of 60% [37].

Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) was based on a gene-by-gene allele calling of 3002 target genes with quality parameters as previously established for *Salmonella* isolates [38]. The in silico MLST was conducted using SeqSphere+ software. To visualize the clonal relationship between isolates, a minimum spanning tree was created. For this, the “pairwise ignoring missing values” option was turned on when using the abovementioned software. Accordingly, closely related isolates with a maximum difference of seven alleles were subsequently assigned to clusters.

To investigate the epidemiology of the mountain pasture outbreak in Garmisch-Partenkirchen and to zoom into the molecular background of the involved isolates, a single-nucleotide polymorphism (SNP)-based phylogenetic analysis of Cluster 1 was performed using BioNumerics software version 7.6 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium). Initially, sequencing reads of Isolate 1 of the investigated panel were used as the index and mapped to the reference strain *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Dublin strain ATCC 39184 (NCBI accession CP019179.1). Thereafter, the sequencing reads of all Cluster 1 isolates were mapped to the index isolate using the default settings. Subsequently, SNPs were determined using the following SNP filtering settings: (i) each retained SNP position has a minimum of 10 × coverage, (ii) the minimum distance between retained SNP positions is 12 bp, and (iii) nondiscriminatory positions between the isolates are removed. Retained SNPs served as a basis for phylogenetic cluster analyses to determine the SNP similarity matrix.

The raw sequencing data were deposited at the European Nucleotide Archive (ENA project number: PRJEB50766).

### 3. Results

#### 3.1. Identification and Characterization of *S. Dublin*

A total of 54 individual animal disease outbreaks caused by *S. Dublin* were detected in Southern Bavaria between 2017 and 2021. Outbreaks occurred on 48 cattle farms, 2 pig farms, and 2 farms keeping bovines other than cattle (Table 1 and Table S1). One outbreak occurred among cattle of different originating farms on a mountain pasture in the district of Miesbach (mp-MB) in 2020. Another occurred on a mountain pasture in the district of Garmisch-Partenkirchen (mp-GAP) in 2021. Due to issues regarding transmission,

the 2 outbreaks on mountain pastures were investigated more closely and including all recovered isolates in this study. A total of 88 *Salmonella* isolates were processed, and all were identified as belonging to the Dublin serotype using in vitro and in silico methods (Table S1).

**Table 1.** Metadata and cgMLST results for 88 *S. Dublin* isolates (2017–2021) from 54 animal disease outbreaks were investigated in this study (compare Table S1).

Cluster	Complex Type	Isolate Number	Year	Host	Number of Farms	District
1	1322	42, 51, 56	2017	cattle	3	TÖL
1	1322	45	2017	cattle	1	WM
1	1322	46, 47, 48	2017	cattle	3	GAP
1	1322	2, 4	2019	cattle, dog	1	GAP
1	1322	18	2020	cattle	1	TÖL
1	6745	43, 49, 50, 53	2017	cattle	4	TÖL
1	6745	44	2017	cattle	1	MÜ
1	6745	57	2017	cattle	1	WM
1	6745	52	2017	cattle	1, mp-GAP	GAP
1	6745	58	2018	cattle	1	TÖL
1	6745	6	2019	cattle	1	TÖL
1	6745	19, 24	2020	cattle	2	TÖL
1	6745	22	2020	pig	1	LA
1	6745	36	2021	cattle	1	TÖL
1	6745	39, 40, 70–72, 74–78, 80, 82, 84, 85–90, 92	2021	cattle	6, mp-GAP	GAP
1	6745	38, 83, 94	2021	dog	mp-GAP	GAP
1	6745	79	2021	cattle	mp-GAP	GAP
1	8614	1	2019	cattle	1	TÖL
1	8719	33	2021	cattle	1	GAP
1	9034	54	2017	cattle	1	WM
1	9163	73, 81	2021	cattle	2, mp-GAP	GAP
2	6742	61, 66	2018	bovine	1	RO
2	6742	63, 64, 65, 67, 68	2018	cattle	5	MB
2	6742	5	2019	cattle	1	RO
2	6742	15 *, 16 *, 23	2020	cattle	3, mp-MB *	RO
2	6742	20 *, 25, 32	2020	cattle	3, mp-MB *	MB
2	6742	34, 35	2021	cattle	2	MB
2	6742	37	2021	cattle	1, mp-GAP	GAP
3	6738, 1324	14, 17	2020	cattle	1	TS
3	1324	26, 30, 31	2020	cattle	2	TS
3	1324	27	2020	pig	1	PAF
4	8616	8	2019	cattle	1	TÖL
4	8616	13	2020	cattle	1	M
4	8616	28	2020	bovine	1	TÖL
5	8615	3, 9, 11	2019	cattle	2	TÖL
6	9033	41	2017	cattle	1	RO
6	9033	59	2018	cattle	1	TS
7	9043	60, 62	2018	cattle	2	RO
none	8620	7	2019	cattle	1	RO
none	8623	12	2019	cattle	1	TÖL
none	8626	10	2019	cattle	1	MÜ

mp: mountain pasture, GAP: Garmisch-Partenkirchen, MB: Miesbach, TÖL: Bad Tölz-Wolfratshausen, WM: Weilheim-Schongau, MÜ: Mühldorf, LA: Landshut, RO: Rosenheim, TS: Traunstein, PAF: Pfaffenhofen, M: München. \* is indicating isolates from “mp-MB”.

### 3.2. Antimicrobial Susceptibility

For a subset of 71 isolates, the in vitro antimicrobial susceptibility testing yielded susceptible growth regarding the substances gentamicin, amoxicillin–clavulanate, ampicillin, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, and trimethoprim–sulfamethoxazole. In 3 isolates, 7, 19, and 20, the minimum inhibitory concentration (MIC) revealed an intermediate value for chloramphenicol, whereas all other isolates were susceptible. For Isolate 8, a resistant phenotype was determined for tetracycline. This was the only isolate that showed antimicrobial resistance in this study (Figure 1, Table S1). Regarding the in silico analysis, all isolates revealed the *aac* (6′)-*Iaa* gene, which is a silent, chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase. No further matches in the screened genes coding for antimicrobial resistance were detected using the ResFinder 4.1 database (Table S1).

### 3.3. In Silico Analysis for Virulence and Plasmid Content

The molecular screening for 130 putative virulence factors in silico revealed Gifsy-2 prophage, which encodes a superoxide dismutase (*sodCI*), in all isolates. The chromosomal locus *viaB*, coding for genes for Vi antigen, a capsular polysaccharide virulence antigen, was detected only in all isolates belonging to MLST sequence type (ST) 1494 ( $n = 10$ ). All of the 88 investigated isolates harbored the plasmids IncX1 and IncFII (S), which are associated with virulence (Table S1). The IncA/C2 plasmid associated with multidrug resistance was not found in any of the isolates.

### 3.4. Genomic and Epidemiological Analysis of Animal Disease Outbreaks

This study investigated 54 *S. Dublin* outbreaks that occurred on individual farms and 2 that occurred on mountain pastures in Southern Bavaria from 2017 to 2021 (Tables 1 and S1). All animal disease outbreaks occurred in Upper Bavaria with the exception of a farm keeping solely pigs in Lower Bavaria (Figure 2).

Genotyping was used to characterize all *S. Dublin* strains. The 88 isolates were assigned to three known MLST STs: 10, 1487, and 1494. Furthermore, they were assigned to 16 subordinated *S. Dublin* cgMLST complex types (CTs): 1322, 1324, 6738, 6742, 6745, 8614, 8615, 8616, 8620, 8623, 8626, 8719, 9033, 9034, 9043, and 9163 (Tables 1 and S1, Figure 3). The genotyped isolates were grouped into seven clusters. Three single isolates could not be assigned to any of these clusters (Table 1 and Table S1).

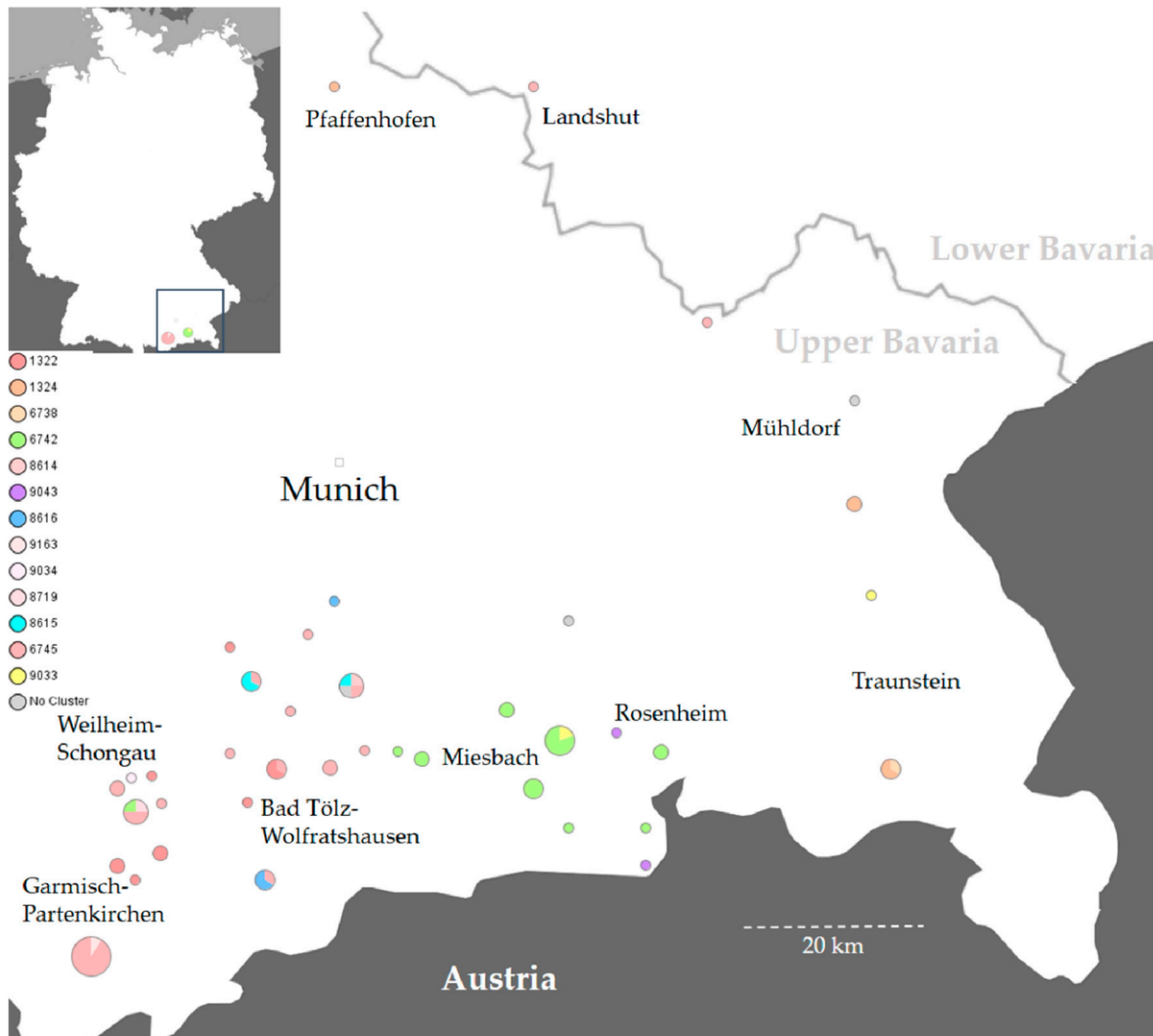
**Cluster 1** contained 52 isolates originating from all over Southern Bavaria. The sampling dates covered the entire 2017–2021 investigation period. Cluster 1 consisted of ST 10 and 6 different CTs: 1322, 6745, 8614, 8719, 9034, and 9163 (Table 1, Figures 3 and 4). Furthermore, SNP typing was carried out to trace back the isolates within this cluster (Figure 5, Table S1).

All isolates from the mountain pasture outbreak in the district of Garmisch-Partenkirchen, mp-GAP, formed unique SNP branching within Cluster 1 and revealed a genetic distance of 2.9 different SNPs at most (Figure 5, Table S1). This outbreak involved 22 cattle from 6 different farms and 2 herding dogs. The sampling yielded 28 ST 10 isolates. These were assigned to Clusters 1 and 2 and revealed the 3 different CTs 6742, 6745, and 9163. One dog was sampled twice, which revealed genetically identical isolates (38 and 83), whereby the latter was collected 4 weeks later. Duplicate samples from 2 cows taken 2 weeks apart also revealed identical genotypes (39 and 71; 75 and 82). Isolates 40 and 73, however, were collected from the same cow 2 weeks apart and revealed the different CTs, 6745 and 9163 (Table 1 and Table S1).

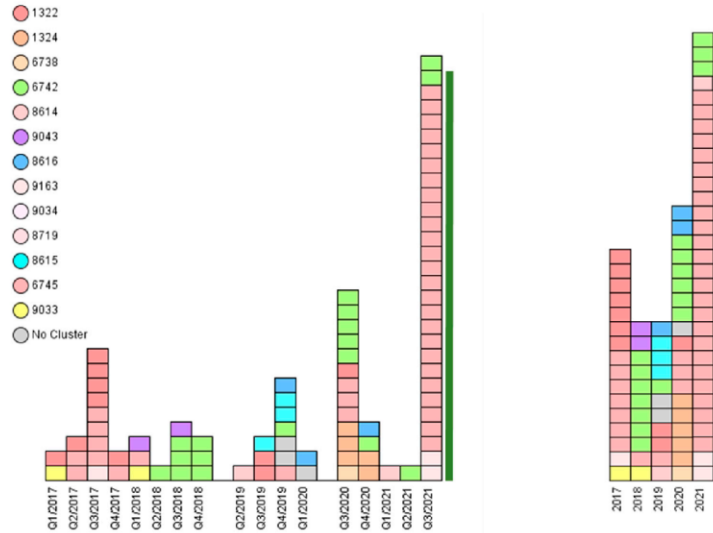
Regarding Farm 49 in the district of Bad Tölz-Wolfratshausen, 4 isolates within Cluster 1 were investigated in the present study (Table S1). Three isolates (87, 88, 89) from 2021 clustered in the distinct mp-GAP group and revealed a ST 10/ CT 6745 genotype. The fourth isolate, Isolate 56, originated from 2017 and belonged to a different CT 1322 (Table S1).

Epidemiological data revealed that animals of Farm 56 in the district of Garmisch-Partenkirchen were kept on the mp-GAP every summer. One of the 2021 *S. Dublin*-positive cows stayed on the mp-GAP in 2015, 2016, 2017, and 2021. Two isolates (52 and 86)

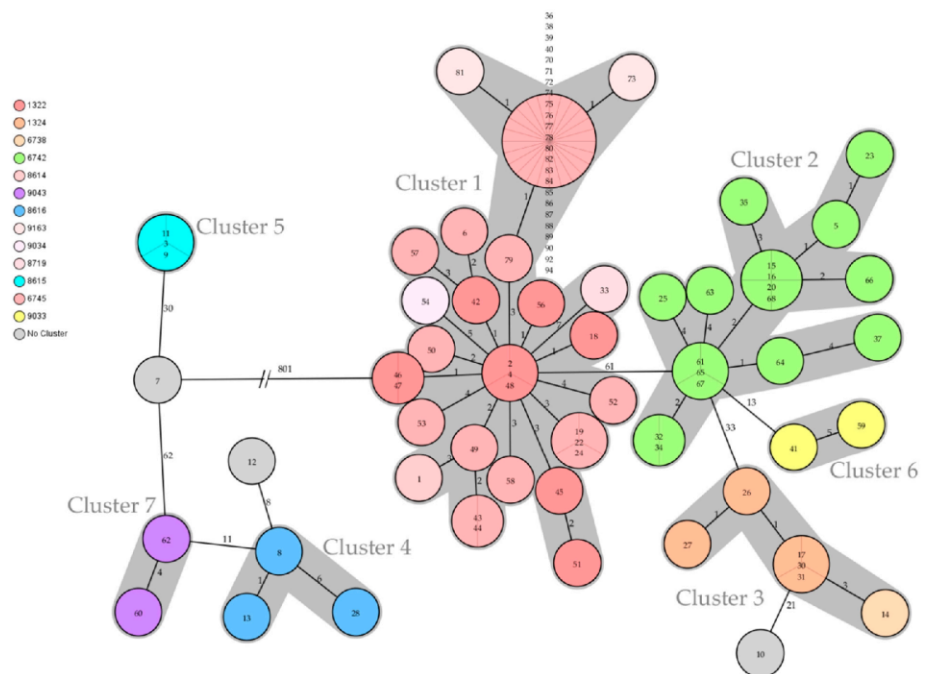
originated from this farm and were collected in 2017 and 2021, and the same genotype ST 10/CT 6745 was identified (Table S1). Isolate 36 revealed a similar genotype as other strains from the mp-GAP origin. However, the epidemiological analysis did not prove any contact between involved animals.



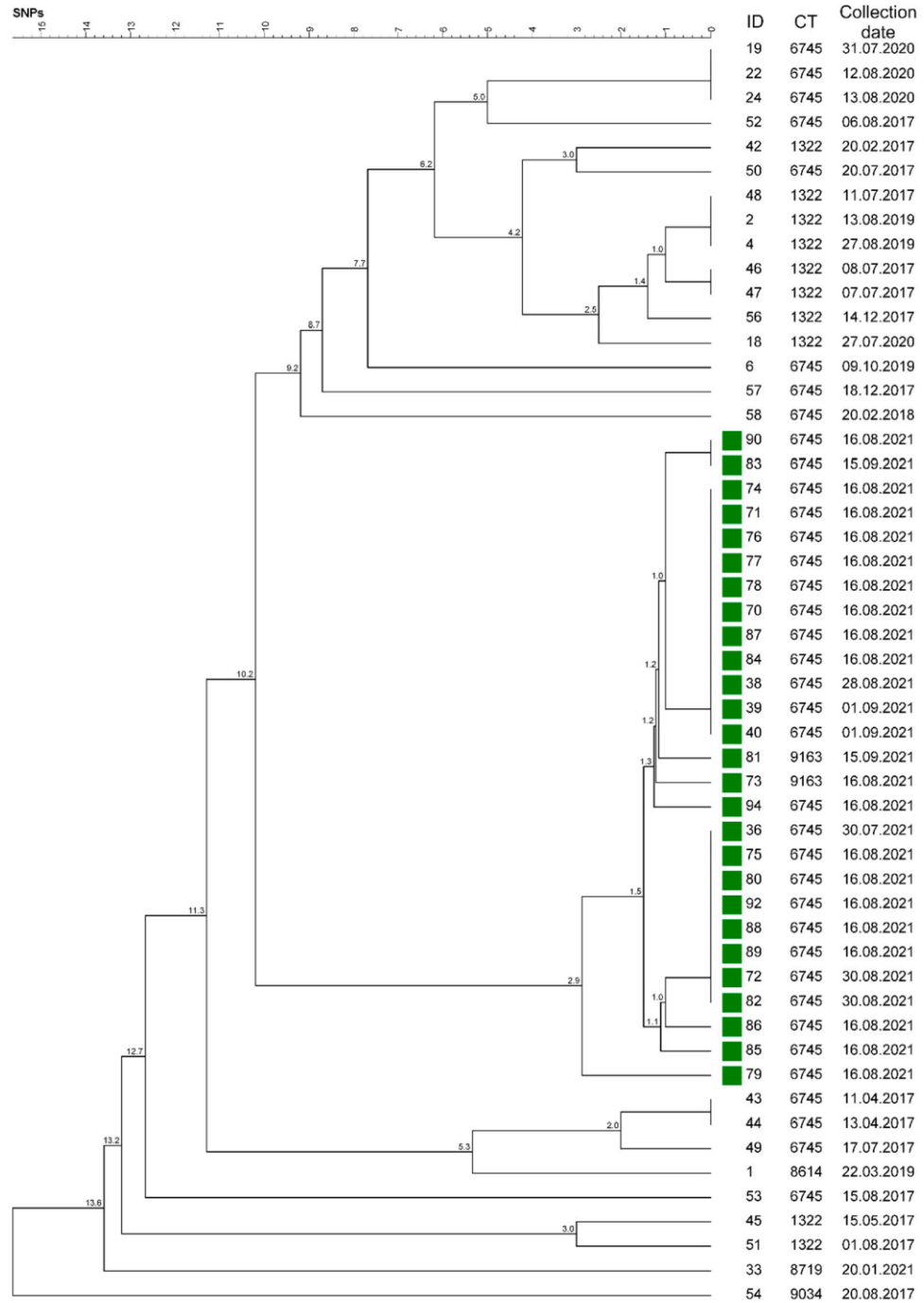
**Figure 2.** A map of Germany (top left) and the respective enlarged map extract depict the two administrative regions of Upper and Lower Bavaria, the state capital Munich, and various districts in Southern Bavaria affected by *Salmonella* Dublin in the 2017–2021 period. The individual clusters and cgMLST complex types (CTs) are highlighted in different colors. A CT legend is reflected on the left side of the map. The circle size represents the number of identified isolates. Cluster 1 (red shades) is dispersed throughout Southern Bavaria, whereas other clusters have a local focus. Isolates that could not be assigned to any cluster are marked in gray. The map was created with SeqSphere+ and Microsoft PowerPoint.



**Figure 3.** The epidemiological analysis of *Salmonella* Dublin animal disease outbreaks in Southern Bavaria revealed assorted genotypes within the 5-year investigation period. Each rectangle represents one isolate. Left: Complex types (CTs) distributed over the quarters (Q1 to Q4) of the years 2017 to 2021. Right: CTs distributed over the years 2017–2021. Most CTs persist over the years. Cluster 1 prevailed in 2017 and 2021. The 28 isolates from a 2021 outbreak on a mountain pasture in Garmisch-Partenkirchen are depicted with a green bar.



**Figure 4.** The minimum spanning tree shows all seven clusters (gray shades) of *Salmonella* Dublin found in Southern Bavaria in the 2017–2021 period. Three isolates could not be assigned to any cluster (gray circle without shade). The colored circles visualize the various cgMLST complex types with the corresponding four-digit numbers listed on the left side of the tree. The circled numbers represent the respective isolate numbers, and the circle size corresponds to the number of isolates sharing the same genotype. The numbers on the connecting lines represent the allele difference between two circles. The tree is based on cgMLST values and SeqSphere+ computations.



**Figure 5.** The phylogenetic tree was calculated on the basis of single-nucleotide polymorphisms (SNPs), including all *Salmonella* Dublin isolates (ID) that revealed a Cluster 1 genotype. The corresponding four-digit cgMLST complex types (CTs) and the collection date of the respective isolate are listed on the right. The isolates marked in green originated from the mountain pasture outbreak in Garmisch-Partenkirchen and revealed a minimal distance of 2.9 SNPs to the latest ancestor. The tree was generated using BioNumerics.

Isolates 2 (cattle) and 4 (herding dog) from one farm in the district of Garmisch-Partenkirchen revealed the same genotype ST 10/CT 1322, originating from a 2019 outbreak. These isolates clustered with Isolate 48 from 2017 and even revealed the same SNP allele

profile (Figures 4 and 5). The epidemiological analysis could not ascertain a possible transmission route due to the time discrepancy and missing animal connection.

In 2020, one animal disease outbreak occurred on a farm solely keeping pigs in the district of Landshut. This was the only outbreak to originate in Lower Bavaria. The respective genotype of Isolate 22 matched ST 10/CT 6745, which constitutes the most frequently found genotype in the study (Table 1). Two more isolates (19 and 24) revealed an identical SNP allele profile (Figure 5). These two originated from different farms, both in the district of Bad Tölz-Wolfratshausen (Table S1). All three strains were isolated in 2020. No further links were found in the epidemiological analysis.

Isolates 46 and 47 originated from farms in the district of Garmisch-Partenkirchen in 2017. The genotypes of these isolates were identical ST 10/CT 1322 (Table S1).

Isolate 43 clustered with Isolate 44, originating from the districts of Bad Tölz-Wolfratshausen and Mühldorf am Inn. Both isolates were collected in 2017 and matched to the ST 10/CT 6745 genotype, but no further epidemiological correlation was identified (Table S1).

**Cluster 2** consisted of 17 isolates originating from 16 farms in the districts of Rosenheim, Miesbach, and Garmisch-Partenkirchen, all in Upper Bavaria. All isolates exclusively revealed genotype ST 10/CT 6742 (Table S1). In this cluster, the contact between three animals from three different farms was traced back to the aforementioned mountain pasture in the district of Miesbach, mp-MB, in 2020. The respective isolates (15, 16, 20) were therefore assigned to the mp-MB outbreak (Table S1). The genotype of this mountain pasture outbreak was found on 12 farms in two districts and the mp-GAP. Furthermore, two closely related isolates (Isolates 32 and 34) originated from two different farms in the district of Miesbach (Figure 4). The isolates were collected 8 months apart, and a transmission source could not be identified in the epidemiological analysis.

**Cluster 3** contained six strains from four different farms in the districts of Traunstein and Pfaffenhofen. These were exclusively isolated in the autumn and winter of 2020 (Table 1, Figure 3). Isolates 30 and 31, originating from the same farm, showed the same genotype ST 1487/CT 1324. Isolate 17 revealed an identical genotype and originated from a different farm in the district of Traunstein. A connection between these two farms could not be ascertained. In regard to another animal disease outbreak, two isolates (17 and 14) were collected from the same farm, but they revealed the different genotypes ST 1487/CT 1324 and ST 1487/CT 6738. These samples were taken 24 days apart (Table S1).

Two more animal disease outbreaks on different farms in Cluster 3 revealed the same genotype ST 1487/CT 1324 (Isolates 26 and 27). One of these outbreaks (Isolate 27) emerged from a pig farm (Table S1).

**Cluster 4** consisted of three isolates and three individual animal disease outbreaks in the districts of Bad Tölz-Wolfratshausen and Munich. The Cluster 4 genotypes exclusively revealed ST 1494/CT 8616. Each outbreak occurred within a time difference of 6 months (Table S1). Epidemiological investigations revealed cattle trade between Farm 42 (Cluster 1, Isolate 6) and Farm 11 (Cluster 4, Isolate 8) in September 2019 (Table S1).

**Cluster 5** also consisted of three isolates and two animal disease outbreaks solely in the district of Bad Tölz-Wolfratshausen. All isolates showed ST 1494/CT 8615. The epidemiological analysis revealed regular animal movements between Farm 16 (Isolate 9) and Farm 1 (Isolates 3 and 11) during the sampling period. Isolates 3 and 11 were collected at the same farm 6 months apart (Table S1).

**Cluster 6** contained isolates, which caused outbreaks among cattle and occurred in the years 2017 and 2018. Both isolates revealed ST 10/CT 9033 (Table S1). The epidemiological analysis determined a different district of origin and no contact between animals.

**Cluster 7** included strains from two different farms in the same district that were isolated 5 months apart (Table S1). Again, no connection was discovered in the epidemiological analysis.

Three isolates (7, 10, 12) did not cluster with any other isolates and revealed three different genotypes, ST 1494/CT 8620, ST 1494/CT 8623, and ST 1487/CT 8626 (Tables 1 and S1).



Despite the different genotypes of Isolates 6 and 12, the epidemiological analysis revealed a joint transfer of animals originating from two farms in the district of Bad Tölz-Wolfratshausen (Table 1 and Table S1; Figures 2 and 4). The epidemiological analysis of all isolates except those originating from Cluster 1 revealed either a joint geographic focus or a temporal limitation (Table 1, Figures 2 and 3).

#### 4. Discussion

In the present study, *S. Dublin* isolates from bovines, pigs, and herding dogs in Southern Bavaria between 2017 and 2021 were characterized using antimicrobial susceptibility testing and whole-genome sequencing. Assembling these analyses and the epidemiological context, a comprehensive animal disease outbreak investigation was conducted.

##### 4.1. Challenges Regarding Routine Laboratory Diagnostics and Animal Disease Outbreak Investigation

The sensitivity of detecting *S. Dublin* in clinical samples depends on the degree of pathogen colonization in the host animal. If clinically ill cattle shed concentrations of more than 100 colony-forming units per gram of feces, *S. Dublin* will be diagnosed with a probability of 60–100% even from rectal swabs [39]. According to prior publication, subclinically infected cattle shed lower amounts of bacteria, and the sensitivity rate drops to 16–20% [8]. In the present study, each index animal showed clinical signs of illness, but the majority of all investigated animals were apparently healthy. *Salmonella* hosted by intermittently shedding individuals might not be detected at all if samples are taken during a nonshedding period [11]. Hence, as mandated by German law, the number and timeline of required tests are specified prior to resetting the status of a formerly *Salmonella*-positive herd to negative [25]. In the present study, the corresponding investigations were conducted, which resulted in the diagnosis of 54 animal disease outbreaks. All listed outbreaks were resolved during the study time (Table S1). Moreover, in the present study, genome sequencing was applied on selected outbreak isolates. High-resolution genotyping proved that most of the outbreaks revealed one individual genotype. As an exception, Isolates 2, 4, and 48 yielded an identical SNP-based genotype (Figure 5). Isolates 2 (cow origin) and 4 (dog origin) were collected from the same farm in July 2017. However, Isolate 48 was obtained from a cow belonging to a different farm and occurred 2 years later in August 2019 (Table 1 and Table S1). Such a finding is unusual. Although the epidemiological analysis did not ascertain a connection, it is most likely that contact had taken place between animals for these two outbreaks. In this case, however, it remains unknown whether the source of the second outbreak was a still-carrying animal or an inanimate vector.

Various *Salmonella* serovars are known to potentially cause disease of variable severity in specific hosts [20]. This may be due to differences in pathogen virulence but also due to varying susceptibility of the host to a specific serovar [40]. Therefore, serotyping of *Salmonella* is crucial for human and animal diagnostics worldwide [20]. Furthermore, serotyping may support the delineation of an animal disease outbreak and reveal possible transmission routes [41]. In the present 5-year study, we found *S. Dublin* in two out of seven administrative regions in Bavaria (Figure 2). Despite the adaptation to cattle, three dogs also shed *S. Dublin* (Table 1). The pathogen could have caused an infection in the dogs, or the dogs could have been passive carriers. The 2 weeks of time between the sampling of Isolates 38 and 83 from the same dog could be indicative of an infection (Table S1). Furthermore, classical serotyping is time-consuming and not always successful [42]. Our serotyping results were precisely reproduced by the application of the whole-genome “genoserotyping” tool (Table S1). In regard to future whole-genome routine laboratory diagnostics, hands-on time may be reduced by switching directly to *in silico* genoserotyping. This procedure was previously been proven to be of value by other authors [29]. To date, genoserotyping still has its limitations in routine diagnostics of rare *Salmonella* serovars [43,44]. However, publicly accessible genome databases are growing rapidly so that the identification of

rare *Salmonella* serovars and comprehensive genoserotyping will be possible in the near future [44].

#### 4.2. *Salmonella* Dublin as a Zoonosis

As stated in a review comprising data for *S. Dublin* infections in humans from 1968 to 2013, the pathogen is currently considered an emerging pathogen [18]. Virulence factors contribute to the pathogenicity of *S. Dublin* isolates [45]. Furthermore, recent data revealed that the proportion of resistance in *S. Dublin* isolates in the United States is higher than in other *Salmonella* serotypes [18,19,46]. Furthermore, *S. Dublin* is one of the serotypes showing the highest multidrug resistance [19]. Data from the European Food Safety Authority (EFSA) indicate ongoing and overall high levels of antimicrobial resistance regarding *Salmonella* in the European Union [47]. However, the results of the present study revealed no significant antimicrobial resistance of the serovar Dublin via either in vitro or in silico approaches (Figure 1, Table S1). The reliability of in silico antimicrobial susceptibility prediction of *Salmonella* isolated from bovine sources has been previously described, showing results similar to this study [48,49]. According to published worldwide comparison data, nearly all cases of antimicrobial resistance genes in *S. Dublin* seem to occur in the United States [50]. Previously published Germany-specific data support the results of our current study and reveal that multidrug resistance in *S. Dublin* is uncommon in this country [29]. The situation in Denmark, another European country, is similar to the German status of low multidrug resistance in *S. Dublin* [51]. Pursuant to German federal law, antibiotic treatment of livestock is restricted and closely monitored to curb antimicrobial resistance [52,53]. The treatment options list a serovar-specific *Salmonella* vaccine for the entire cattle herd as well as the elimination of carrier animals [54,55]. In comparison with the situation in North America, the repeatedly published low multidrug resistance and virulence of *S. Dublin* in Germany evidences a lower risk and better treatment situation for human patients with *S. Dublin* infection. This goal is in congruence with the One Health objective.

Concerning four previously reported human *S. Dublin* cases in Bavaria, three occurred in 2017 with no geographic proximity to animal cases. The fourth case, however, emanated from the district of Traunstein in 2020, the same district and year as Cluster 3 Isolates 14, 17, 26, 30, and 31 were collected (Figure 2, Table S1) [24]. Salmonellosis in humans may emerge after their consumption of contaminated raw beef, raw milk, or raw milk cheese [18,56]. Patients with underlying chronic diseases are more susceptible to salmonellosis and severe disease progression [16,19,56]. In Denmark, an isolate collected from an infected human was linked to a beef isolate and the respective cattle herd [51]. The patient data of the Traunstein case were not obtained, and human isolates were not compared with isolates of the present study. Nevertheless, such a comparison would be an interesting project.

#### 4.3. *Epidemiology with a Special Focus on Mountain Pastures*

*S. Dublin* has been repeatedly isolated in some regions of Germany, but the pathogen has never been described in certain other regions [29]. In the present study, all bovine isolates originated solely from one out of the seven administrative regions in Bavaria (Table S1). From 2017 to 2021, a total of 152 outbreaks of bovine salmonellosis were detected in all of Bavaria. *S. Dublin* was the cause of 46% of these outbreaks (data not shown). The pasturing of cattle on alpine meadows is a unique tradition in Upper Bavaria [57]. In addition to animal welfare, the improved quality of the resultant food products distinguishes this favored tradition of cattle farming in the Alps [58]. In the summer months, cattle are herded communally on mountain pastures. Hence, this tradition poses some cross-infection risk for the cattle [12]. In the present study, mountain pastures were identified as a transmission focus for *S. Dublin* between animals of different farm origins. In assessing the broad variety of *S. Dublin* genotypes found in local connection to mountain pastures, we conclude that these represent a natural focus (Figures 4 and 5). Similar observations have been made in Tyrol, the main district of alpine pasturing in Austria. The enzootic *Salmonella* infection of

adult cattle was mentioned as a typical contagious disease [12]. Tyrol shares a border with Upper Bavaria.

According to prior observations, subclinical shedding of *Salmonella* has been linked to stress during transport [59,60]. At the beginning of the pasturing season in Bavaria, there are cattle drives, often over fairly long distances in unfamiliar terrain, to reach the mountain pastures [57]. Such transfer might cause stress in still carriers. An onset or increased shedding might then lead to *S. Dublin* accumulation on grazing grounds, thus posing an increased risk of infection for other animals.

As published, *S. Dublin* may last for at least 119 days in feces on grounds such as pastures in the summer and may also be viable after 87 days in surface water [9]. Wet pastures covered with fecal droppings that are contaminated with *Salmonella* provide ideal conditions for a fast spread of infection between different animals [12,61]. In the described outbreak on a mountain pasture in Garmisch-Partenkirchen, *S. Dublin* was isolated from 28 animals, including cattle and two dogs. Genotyping revealed that the isolates could be assigned to two clusters, three different cgMLST complex types, and nine branches of the phylogenetic SNP tree (Figure 5, Table S1). This fairly broad variety of detected genotypes could be an indication that the outbreak may have lasted longer than the summer season of 2021 and might even exceed the present animal disease outbreak investigations. Our conclusion is supported by the fact that *Salmonella* may also survive in a viable but nonculturable condition in the natural focus of “alpine pasture” for an even longer time than the 119 days listed above [62].

In our study, we found isolates with the same cgMLST complex type over several successive quarters of years (Figures 3 and 5). This finding is congruent with published data stating that *S. Dublin* may persist in cattle herds for years [8,9,51,63,64]. Isolates 3 and 11, 30 and 31, and 61 and 66 were isolated as pairs from the same farm, were assigned to the same outbreak, and revealed the same genotype. It was of note that the samples had been obtained up to 6 months apart (Table S1). This particular phenomenon has been described previously for *Salmonella*, indicating a high degree of host adaptation and a concomitant low mutation rate at the nucleotide level. Consequently, this characteristic allows epidemiological investigations using whole-genome analysis [26,65,66].

Due to the high prevalence of *S. Dublin* in Upper Bavaria, we are referring to this administrative region as “endemic” and list the prevalent ST and CT genotypes in this study (Table 1 and Table S1). Our data show that in an endemic region, animal disease outbreaks can be caused by multiple genotypes. The high-resolution outbreak investigation of the mp-GAP revealed three different genotypes (Table 1). Thus, whole-genome sequencing of multiple isolates per outbreak provides valuable information for epidemiological investigations. Sequencing one isolate per outbreak or using serotyping as the only method may not provide sufficient information. The data in this study could not confirm previous epidemiological investigations that distinguished isolates from endemic regions from those from nonendemic regions [26,29]. However, a thorough traceback to one single index case per outbreak was not successful in this study. Again, this limitation has been described previously [26]. Since *S. Dublin* may persist in herds or natural foci, the initial epidemiological contact could have occurred years ago. As published, the distribution of *S. Dublin* in cattle has been consistently linked to transport or movement of infected animals [65].

As a “lessons learned” conclusion, cattle should be screened for salmonellosis before being returned to their farms in the fall and before the pasturing season in the summer [12]. Moreover, internal biosecurity measures are recommended for *S. Dublin* control in herds within an endemic region [51]. In addition to culling *S. Dublin*-positive tested cattle, cleansing and disinfection of stables before housing cattle again has proven effective [67]. On alpine pastures, however, biosecurity measures prove to be problematic since there are hardly any boundaries for cattle and wildlife. *S. Dublin* is considered host adapted, and control measures are therefore focused on cattle [8]. The detection of *S. Dublin*-positive dogs and pigs in our study and multiple other species in previous studies [9,68,69] may

be an indication that the focus should be expanded. Further investigations are needed to clarify whether other species represent reservoirs or a source of infection for cattle.

Next-generation sequencing technology provides valuable information. A single testing method provides information about phylogenetics, antimicrobial resistance, and virulence [44]. Regarding One Health, next-generation sequencing enables a rapid and focused response in *S. Dublin* outbreaks.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10050885/s1>: Table S1: Dataset regarding 88 *S. Dublin* isolates recovered from 54 animal disease outbreaks in Southern Bavaria during the 2017–2021 period.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.K., N.S. and J.M.R.; methodology, C.K., N.S., T.Z. and D.E.; software, N.S. and D.E.; validation, C.K., T.Z. and D.E.; formal analysis, N.S. and J.M.R.; investigation, C.K., N.S. and M.H.; resources, D.E., M.H. and J.M.R.; data curation, C.K., N.S., T.Z., D.E. and M.H.; writing—original draft preparation, C.K., N.S., T.Z. and J.M.R.; writing—review and editing, D.E. and M.H.; visualization, N.S., T.Z. and D.E.; supervision, N.S. and J.M.R.; project administration, J.M.R.; funding acquisition, D.E., M.H. and J.M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The raw sequencing data were deposited at the European Nucleotide Archive, ENA project number: PRJEB50766.

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the veterinary bacteriology staff for their excellent technical assistance and Reiner Faul for his critique.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Jajere, S.M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World* **2019**, *12*, 504–521. [CrossRef] [PubMed]
- Schielke, A.; Rabsch, W.; Prager, R.; Simon, S.; Fruth, A.; Helling, R.; Schnabel, M.; Siffczyk, C.; Wiczorek, S.; Schroeder, S.; et al. Two consecutive large outbreaks of *Salmonella* Muenchen linked to pig farming in Germany, 2013 to 2014: Is something missing in our regulatory framework? *EuroSurveill* **2017**, *22*, 30528. [CrossRef] [PubMed]
- Elmberg, J.; Berg, C.; Lerner, H.; Waldenstrom, J.; Hessel, R. Potential disease transmission from wild geese and swans to livestock, poultry and humans: A review of the scientific literature from a One Health perspective. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2017**, *7*, 1300450. [CrossRef] [PubMed]
- Sakaguchi, K.; Nevarez, J.G.; Del Piero, F. *Salmonella Enterica* Serovar Pomona Infection in Farmed Juvenile American Alligators (Alligator Mississippiensis). *Vet. Pathol.* **2017**, *54*, 316–319. [CrossRef] [PubMed]
- Zajac, M.; Skarzynska, M.; Lalak, A.; Kwit, R.; Smialowska-Weglinska, A.; Pasim, P.; Szulowski, K.; Wasył, D. *Salmonella* in Captive Reptiles and Their Environment—Can We Tame the Dragon? *Microorganisms* **2021**, *9*, 1012. [CrossRef] [PubMed]
- Bonifait, L.; Thepault, A.; Bauge, L.; Rouxel, S.; Le Gall, F.; Chemaly, M. Occurrence of *Salmonella* in the Cattle Production in France. *Microorganisms* **2021**, *9*, 872. [CrossRef] [PubMed]
- Wissmann, J.E.; Kirchhoff, L.; Bruggemann, Y.; Todt, D.; Steinmann, J.; Steinmann, E. Persistence of Pathogens on Inanimate Surfaces: A Narrative Review. *Microorganisms* **2021**, *9*, 343. [CrossRef]
- Nielsen, L.R. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet. Microbiol.* **2013**, *162*, 1–9. [CrossRef]
- Field, H.I. A survey of bovine salmonellosis in mid and west Wales. *Br. Vet. J.* **1948**, *104*, 323–339. [CrossRef]
- McCaughy, W.; McClelland, T.; Hanna, J. Some observations on *Salmonella* dublin infection in clinically healthy beef cattle. *Br. Vet. J.* **1971**, *127*, 549–556. [CrossRef]
- Nielsen, L.R.; Schukken, Y.H.; Grohn, Y.T.; Ersböll, A.K. *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: Risk factors for becoming a carrier. *Prev. Vet. Med.* **2004**, *65*, 47–62. [CrossRef] [PubMed]
- Allerberger, F.; Liesegang, A.; Grif, K.; Khaschabi, D.; Prager, R.; Danzl, J.; Höck, F.; Öttl, J.; Dierich, M.P.; Berghold, C. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. *Wien. Med. Wochenschr.* **2003**, *153*, 148–152. [CrossRef] [PubMed]
- Wray, C.; Sojka, W.J. Reviews of the progress of dairy science: Bovine salmonellosis. *J. Dairy Res.* **1977**, *44*, 383–425. [CrossRef] [PubMed]

14. Mandal, B.K.; Brennand, J. Bacteraemia in salmonellosis: A 15 year retrospective study from a regional infectious diseases unit. *BMJ* **1988**, *297*, 1242–1243. [CrossRef]
15. Jones, T.F.; Ingram, L.A.; Cieslak, P.R.; Vugia, D.J.; Tobin-D'Angelo, M.; Hurd, S.; Medus, C.; Cronquist, A.; Angulo, F.J. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 109–114. [CrossRef]
16. Fang, F.C.; Fierer, J. Human infection with *Salmonella* dublin. *Medicine* **1991**, *70*, 198–207. [CrossRef]
17. Helms, M.; Vastrup, P.; Gerner-Smidt, P.; Molbak, K. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: Registry based study. *BMJ* **2003**, *326*, 357. [CrossRef]
18. Harvey, R.R.; Friedman, C.R.; Crim, S.M.; Judd, M.; Barrett, K.A.; Tolar, B.; Folster, J.P.; Griffin, P.M.; Brown, A.C. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Dublin Infections among Humans, United States, 1968–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1493–1501. [CrossRef]
19. McDonough, P.L.; Fogelman, D.; Shin, S.J.; Brunner, M.A.; Lein, D.H. *Salmonella enterica* serotype Dublin infection: An emerging infectious disease for the northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 2418–2427. [CrossRef]
20. van Asten, A.J.; van Dijk, J.E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *44*, 251–259. [CrossRef]
21. Van Schaik, G.; Klinkenberg, D.; Veling, J.; Stegeman, A. Transmission of *Salmonella* in dairy herds quantified in the endemic situation. *Vet. Res.* **2007**, *38*, 861–869. [CrossRef] [PubMed]
22. Methner, U. Salmonellose der Rinder. In *Tiergesundheitsjahresbericht 2017*; Korr, F., Ed.; Tiergesundheitsjahresbericht; Friedrich-Loeffler-Inst.: Greifswald, Germany, 2018; Volume 18, p. 105111.
23. Methner, U. Salmonellose der Rinder. In *Tiergesundheitsjahresbericht 2019*; Tiergesundheitsjahresbericht; Friedrich-Loeffler-Inst.: Greifswald, Germany, 2020; Volume 20, pp. 92–98.
24. Robert-Koch-Institut. SurvStat@RKI 2.0. Available online: <https://survstat.rki.de> (accessed on 24 October 2021).
25. The Federal Ministry of Justice. *Regulation on the Protection against Salmonellosis in Cattle (Cattle Salmonellosis Regulation) of 14 November 1991 (BGBl. I p. 2118), Amended by Article 2 of 17 April 2014 (BGBl. I p. 388)*; Bundesministerium der Justiz: Berlin, Germany, 1991.
26. Agren, E.C.; Wahlstrom, H.; Vesterlund-Carlson, C.; Lahti, E.; Melin, L.; Soderlund, R. Comparison of whole genome sequencing typing results and epidemiological contact information from outbreaks of *Salmonella* Dublin in Swedish cattle herds. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2016**, *6*, 31782. [CrossRef] [PubMed]
27. European Committee for Standardization. *Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella—Part 1: Detection of Salmonella Spp.*, German version EN ISO 6579-1:2017 + A1:2020; Beuth Verlag GmbH: Berlin, Germany, 2020; p. 66. [CrossRef]
28. Grimont, P.A.; Weill, F.-X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*; WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella: Paris, France, 2007; Volume 9, pp. 1–166.
29. Garcia-Soto, S.; Tomaso, H.; Linde, J.; Methner, U. Epidemiological Analysis of *Salmonella Enterica* Subsp. *Enterica* Serovar Dublin in German Cattle Herds Using Whole-Genome Sequencing. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e0033221. [CrossRef] [PubMed]
30. The Bavarian State Ministry of Food, Agriculture and Forestry. Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere (HIT). Available online: <https://www3.hi-tier.de/HitCom/login.asp> (accessed on 28 February 2022).
31. Friedrich-Loeffler-Institut. TierSeuchenNachrichten-System (TSN). Available online: <https://tsn.fli.de/Auth/Forms/Login.aspx?ReturnUrl=%2f> (accessed on 28 February 2022).
32. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, 5th ed.; CLSI Supplement VET01S; Clinical and Laboratory Standards Institute: New York, NY, USA, 2020.
33. Technical University of Denmark. SeqSero 1.2. Available online: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/SeqSero/> (accessed on 20 October 2021).
34. Zhang, S.; Yin, Y.; Jones, M.B.; Zhang, Z.; Deatherage Kaiser, B.L.; Dinsmore, B.A.; Fitzgerald, C.; Fields, P.I.; Deng, X. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 1685–1692. [CrossRef] [PubMed]
35. Technical University of Denmark. ResFinder 4.1. Available online: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> (accessed on 7 February 2022).
36. Institute of Pathogen Biology; CAMS & PUMC. Virulence Factor Database (VFDB). Available online: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm> (accessed on 3 February 2022).
37. Technical University of Denmark. PlasmidFinder 2.1. Available online: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/> (accessed on 4 February 2022).
38. Uelze, L.; Becker, N.; Borowiak, M.; Busch, U.; Dangel, A.; Deneke, C.; Fischer, J.; Flieger, A.; Hepner, S.; Huber, I.; et al. Toward an Integrated Genome-Based Surveillance of *Salmonella enterica* in Germany. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 626941. [CrossRef]
39. Richardson, A.; Fawcett, A.R. *Salmonella* dublin infection in calves: The value of rectal swabs in diagnosis and epidemiological studies. *Br. Vet. J.* **1973**, *129*, 151–156. [CrossRef]
40. Uzzau, S.; Brown, D.J.; Wallis, T.; Rubino, S.; Leori, G.; Bernard, S.; Casadesus, J.; Platt, D.J.; Olsen, J.E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* **2000**, *125*, 229–255. [CrossRef]
41. Herikstad, H.; Motarjemi, Y.; Tauxe, R.V. *Salmonella* surveillance: A global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.* **2002**, *129*, 1–8. [CrossRef]

42. Wattiau, P.; Boland, C.; Bertrand, S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: Gold standards and alternatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 7877–7885. [[CrossRef](#)]
43. Zhang, S.; den Bakker, H.C.; Li, S.; Chen, J.; Dinsmore, B.A.; Lane, C.; Lauer, A.C.; Fields, P.I.; Deng, X. SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*. [[CrossRef](#)]
44. Ibrahim, G.M.; Morin, P.M. *Salmonella* serotyping using whole genome sequencing. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mohammed, M.; Le Hello, S.; Leekitcharoenphon, P.; Hendriksen, R. The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Srednik, M.E.; Lantz, K.; Hicks, J.A.; Morningstar-Shaw, B.R.; Mackie, T.A.; Schlater, L.K. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J.* **2022**, *20*, e07209. [[CrossRef](#)]
48. Paudyal, N.; Pan, H.; Elbediwi, M.; Zhou, X.; Peng, X.; Li, X.; Fang, W.; Yue, M. Characterization of *Salmonella* Dublin isolated from bovine and human hosts. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 226. [[CrossRef](#)]
49. Carroll, L.M.; Wiedmann, M.; den Bakker, H.; Siler, J.; Warchocki, S.; Kent, D.; Lyalina, S.; Davis, M.; Sischo, W.; Besser, T.; et al. Whole-Genome Sequencing of Drug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates from Dairy Cattle and Humans in New York and Washington States Reveals Source and Geographic Associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*. [[CrossRef](#)]
50. Fenske, G.J.; Thachil, A.; McDonough, P.L.; Glaser, A.; Scaria, J. Geography Shapes the Population Genomics of *Salmonella enterica* Dublin. *Genome Biol. Evol.* **2019**, *11*, 2220–2231. [[CrossRef](#)]
51. Kudirkiene, E.; Sorensen, G.; Torpdahl, M.; de Knecht, L.V.; Nielsen, L.R.; Rattenborg, E.; Ahmed, S.; Olsen, J.E. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Dublin in Cattle and Humans in Denmark, 1996 to 2016: A Retrospective Whole-Genome-Based Study. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*. [[CrossRef](#)]
52. The Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL). *Report of the Federal Ministry of Food and Agriculture on the Evaluation of the Antibiotics Minimisation Concept introduced with the 16th Act to Amend the Medicinal Products Act. (16th AMG Amendment)*; BMEL: Bonn, Germany, 2019.
53. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. Article 107. 2018.
54. Foster, N.; Tang, Y.; Berchieri, A.; Geng, S.; Jiao, X.; Barrow, P. Revisiting Persistent *Salmonella* Infection and the Carrier State: What Do We Know? *Pathogens* **2021**, *10*, 1299. [[CrossRef](#)]
55. Methner, U. Salmonellose der Rinder. *Amstierärztlicher Dienst Und Lebensm.* **2012**, *4*, 1–4.
56. Vaillant, V.; Haeghebaert, S.; Desenclos, J.C.; Bouvet, P.; Grimont, F.; Grimont, P.A.; Burnens, A.P. Outbreak of *Salmonella* dublin infection in France, November–December 1995. *EuroSurveill* **1996**, *1*, 9–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. The Bavarian State Ministry of Food, Agriculture and Forestry. *Alm-und Alpwirtschaft in Bayern*; Bayerisches Staatsministerium für Ernährung: Landwirtschaft und Forsten, Bayern, 2010.
58. Krogmeier, D.; Kimmmerle, A.; Schmidt, E.; Götz, K. The effect of Alpine pasturing of heifers on the longevity and on different yield traits of cows in Simmental and Brown Swiss cattle. *Züchtungskunde* **2015**, *87*, 107–119.
59. Wray, C.; Todd, N.; McLaren, I.M.; Beedell, Y.E. The epidemiology of *Salmonella* in calves: The role of markets and vehicles. *Epidemiol. Infect.* **1991**, *107*, 521–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Gronstol, H.; Osborne, A.D.; Pethiyagoda, S. Experimental *Salmonella* infection in calves. 2. Virulence and the spread of infection. *J. Hyg.* **1974**, *72*, 163–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Wray, C.; Davies, R.H. *Salmonella* Infections in Cattle. In *Salmonella in Domestic Animals*; Wray, C., Wray, A., Eds.; CABI Publishing: Oxon, UK, 2000; pp. 169–190.
62. Maynaud, G.; Pourcher, A.M.; Ziebal, C.; Cuny, A.; Druilhe, C.; Steyer, J.P.; Wery, N. Persistence and Potential Viable but Non-culturable State of Pathogenic Bacteria during Storage of Digestates from Agricultural Biogas Plants. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Boqvist, S.; Vagsholm, I. Risk factors for hazard of release from *Salmonella*-control restriction on Swedish cattle farms from 1993 to 2002. *Prev. Vet. Med.* **2005**, *71*, 35–44. [[CrossRef](#)]
64. Nielsen, L.R.; Kudahl, A.B.; Ostergaard, S. Age-structured dynamic, stochastic and mechanistic simulation model of *Salmonella* Dublin infection within dairy herds. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *105*, 59–74. [[CrossRef](#)]
65. de Knecht, L.V.; Kudirkiene, E.; Rattenborg, E.; Sorensen, G.; Denwood, M.J.; Olsen, J.E.; Nielsen, L.R. Combining *Salmonella* Dublin genome information and contact-tracing to substantiate a new approach for improved detection of infectious transmission routes in cattle populations. *Prev. Vet. Med.* **2020**, *181*, 104531. [[CrossRef](#)]
66. Mohammed, M.; Cormican, M. Whole genome sequencing provides insights into the genetic determinants of invasiveness in *Salmonella* Dublin. *Epidemiol. Infect.* **2016**, *144*, 2430–2439. [[CrossRef](#)]
67. Watson, W.A.; Wood, B.; Richardson, A. *Salmonella* dublin infection in a beef herd. *Br. Vet. J.* **1971**, *127*, 294–298. [[CrossRef](#)]

- 
68. Liebana, E.; Garcia-Migura, L.; Clouting, C.; Cassar, C.A.; Clifton-Hadley, F.A.; Lindsay, E.A.; Threlfall, E.J.; Chappell, S.A.; Davies, R.H. Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 732–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  69. Dietz, H.H.; Chriel, M.; Andersen, T.H.; Jorgensen, J.C.; Torpdahl, M.; Pedersen, H.; Pedersen, K. Outbreak of *Salmonella* Dublin-associated abortion in Danish fur farms. *Can. Vet. J.* **2006**, *47*, 1201–1205. [[PubMed](#)]

## IV. DISKUSSION

### 1. One Health und aktuelle Entwicklung der Resistenzlage

Der Begriff „One Health“ beschreibt die Bemühungen um das ganzheitliche Wohlbefinden und die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt. Die Voraussetzung für One-Health-Ziele ist eine weltweite und insbesondere interdisziplinäre Zusammenarbeit (STADTLANDER, 2015). In Deutschland wurde auch in diesem Zusammenhang ein Projekt zur nationalen Überwachung von *Salmonella enterica* ins Leben gerufen. Durch zentralisierte Verarbeitung von Sequenzierdaten werden Salmonellen-Isolate von Menschen, Tieren, Lebensmitteln und Futtermitteln analysiert, Cluster detektiert und somit die Ausbruchsaufklärung unterstützt (UELZE et al., 2021). Die Serovar Dublin ist in diesem Projekt bisher nicht abgebildet, obwohl das Übertragungspotenzial vom Rind auf den Menschen bekannt ist. Wie publiziert, ergab die Vollgenomanalyse in einem Fall identische Isolate aus einer Rinderherde, von zum Konsum freigegebenem Rindfleisch, sowie einer epidemiologisch im Zusammenhang stehenden Infektion beim Menschen. Dieser Fall ist somit ein gutes Beispiel für eine gelungene Rückverfolgung „vom Hof auf den Tisch“ im Rahmen des One-Health-Aspekts (KUDIRKIENE et al., 2020). Gemäß einer anderen Publikation aus Frankreich konnte in kurzer Zeit ein mit *S. Dublin* kontaminierter Rohmilchkäse als Quelle für humane Erkrankungen mittels Vollgenomanalyse bestätigt werden (UNG et al., 2019). Als Konsequenz aus der Rückverfolgung von Ausbruchsketten wurden in den USA in Regionen mit hohen Fallzahlen von *S. Dublin* Infektionen Rohmilchprodukte gänzlich verboten. Nachweislich hat diese Maßnahme dort zu einer lokalen Abnahme der humanen Infektionszahlen mit *S. Dublin* geführt (HARVEY et al., 2017). In Deutschland besteht aktuell aufgrund der wenigen humanen Infektionen mit dieser Serovar neben der Überwachung kein weiterer Handlungsbedarf (Tabelle 2) (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021a, 2021b).

Aufgrund großer wirtschaftlicher Verluste durch *S. Dublin* in Rinderbetrieben existiert in Dänemark seit 2002 ein Überwachungsprogramm, das 2007 sogar in ein Kontrollprogramm umgewandelt wurde. Das Programm beinhaltet die aktive



Überwachung aller Rinderherden sowie freiwillige und auch verpflichtende Maßnahmen, die zur Reduktion entsprechender Keimzahlen in der Umwelt führen (KUDIRKIENE et al., 2020). In diesem Rahmen wird in Dänemark Tankmilch alle vier Monate serologisch auf *S. Dublin* untersucht und die Betriebe entsprechend des Antikörperstatus klassifiziert (NIELSEN, 2013). In den Jahren 2002 bis 2015 hat sich die Zahl der positiv getesteten Betriebe dadurch von 25 auf 7 % verringert (DE KNEGT et al., 2020). Jedoch konnte in Regionen mit hoher Rinderdichte die Prävalenz in Herden nur auf 15 % gesenkt werden. Begründet wird dieses Erkenntnis mit mutmaßlichen Langzeitinfektionen in einer kleinen Anzahl von Herden (KUDIRKIENE et al., 2020).

Aufgrund unterschiedlicher Herangehensweisen in der statistischen Datenerhebung und -auswertung ist der Vergleich der *S. Dublin* Ausbrüche zwischen Deutschland und Dänemark nicht trivial. Dänemark erfasst die Anzahl positiver Herden, während in Deutschland die Anzahl der Ausbrüche erfasst wird. Die Anzahl der humanen Infektionen scheint in Dänemark um das Zwei- bis Dreifache höher als in Deutschland zu sein (Tabelle 2) (WHITHWORTH, 2021). In Dänemark ist auch in den Rinderbeständen insgesamt von einer höheren Anzahl von *S. Dublin* Infektionen auszugehen. Es bleibt jedoch zu bewerten, dass in Deutschland aufgrund der geringen Infektionszahlen, aktuell kein Anlass zur Einführung eines ähnlichen Kontrollprogrammes besteht.

Verglichen mit der Prävalenz von *S. Dublin* sollte die Beobachtung der Resistenzlage dieses Zoonoseerregers in höherem Maße Beachtung finden. Vermutlich hervorgerufen durch den unbedachten Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft wird in den USA seit mehreren Jahren ein Anstieg der Multiresistenzen berichtet (HARVEY et al., 2017). Außerdem werden zunehmend Resistenzen gegen häufig bei Septikämie des Menschen eingesetzte antimikrobielle Substanzen nachgewiesen (HARVEY et al., 2017). Weltweit ist *S. Typhimurium* DT (Definitive Type) 104 ein Sorgenkandidat. Dieser Erreger zeigt multiple Antibiotikaresistenzen, die vermutlich chromosomal verankert sind. Bei nicht-plasmidbasierten Resistenzen besteht die Möglichkeit, dass diese auch ohne Selektionsdruck persistieren (DIRKSEN, 2002; PARKER et al., 2021). Analog könnten die genannten Resistenzen auch in Deutschland aufgrund des

unbedachten Einsatzes von Antibiotika oder durch Veränderung des Erregers auftreten. Die Resistenzlage von *S. Dublin* in Deutschland scheint vorerst auf einem stabilen Niveau niedrig zu sein (GARCIA-SOTO et al., 2021). Ungeachtet dessen sollte die Anzahl der Infektionen mit *S. Dublin* bei Mensch und Rind weiterhin beobachtet und die Resistenzlage kritisch überwacht werden.

## **2. Probenahme und Labordiagnostik**

Der Nachweis von *S. Dublin* kann beim Einzeltier aus Proben von Sekreten und Exkreten, Organmaterial oder Serumproben geführt werden. Abhängig vom Infektionsstadium, der Klinik oder epidemiologischen Besonderheiten der Infektion, ist entsprechendes Probenmaterial zu bevorzugen. Von aktiven Trägertieren sollten Kotproben an drei aufeinanderfolgenden Probenahmen im Abstand von 7 bis 14 Tagen abgenommen werden (WRAY & DAVIES, 2000). In Deutschland ist dies zudem gesetzlich in der Rinder-Salmonellose-Verordnung festgeschrieben (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ, 1991). Gemäß einer Empfehlung ist bei mutmaßlich latenten Trägertieren die Entnahme eines Vaginaltupfers, einer Kot- oder Milchprobe während des Zeitraumes von vier bis fünf Wochen post partum sinnvoll. Grundsätzlich ist hier immer die möglicherweise intermittierende Ausscheidung zu beachten. Insbesondere bei Kälbern fallen etwa 50 % der Kotproben aufgrund der intermittierenden Ausscheidung negativ aus, weshalb immer mehrere Kälber beprobt werden sollten. In einer durch *S. Dublin* verursachten akuten Fieberphase kann die Infektion zudem mittels Blutkultur nachgewiesen werden (WRAY & DAVIES, 2000). Im Falle eines Abortes besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der Erreger im Magen des Fetus und in der Plazenta nachgewiesen werden kann. Handelt es sich jedoch um einen Abort, der durch Endotoxämie des Muttertieres ausgelöst wurde, sind hingegen keine Erreger in den fetalen Proben nachweisbar. Die Herdendiagnostik kann mittels Gülle- oder Umweltproben, im Milchviehbetrieb aber auch anhand eines entsprechenden Milchfilters erfolgen (WRAY & DAVIES, 2000).

Grundsätzlich bietet die kulturelle Untersuchung eine vergleichsweise nur geringe Sensitivität (WRAY & DAVIES, 2000). Hierbei zeigen Studien, dass bei einer

Ausscheidungsmenge von mehr als 100 KbE/g mittels Rektaltupfer die Sensitivität zwischen 60 und 70 % liegt (RICHARDSON & FAWCETT, 1973). Bei gepoolten Kotproben von Kälbern wird die Sensitivität eines positiven Nachweises auf 25 % und bei individuell beprobten Tieren auf 50 % geschätzt. Publizierten Studien zufolge liegt bei älteren Tieren die Sensitivität wahrscheinlich sogar noch darunter (NIELSEN et al., 2004a). Bei Tieren ohne klinische Symptome wird die Sensitivität der Diagnostik einer Einzeltierkotprobe auf 16 bis 20 % geschätzt. Dies kann zum einen an der intermittierenden Ausscheidung oder auch an der niedrigen Salmonellen-Konzentration im Kot zusammenhängen (HOUSE et al., 1993; NIELSEN et al., 2004a; NIELSEN et al., 2007). Nur durch mehrfach wiederholte Beprobung können aktive Trägertiere detektiert werden (HOUSE et al., 1993).

Eine deutlich schnellere Alternative zur kulturellen Erregeranzucht bietet die molekulare Diagnostik, hier die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Bewertung der Sensitivität ist für publizierte Studien jedoch schwierig, da die Ausgangskonzentrationen der Salmonellen im Kot zum einen nicht bestimmt wurden zum anderen werden in einer PCR grundsätzlich nur wenige Mikroliter Probe eingesetzt. Aufgrund der Nesterbildung im Infektionsgeschehen der Salmonellose kann daraus ein falsch negatives Ergebnis resultieren. Der zusätzliche diagnostische Schritt über eine kulturelle Anreicherung sollte aus diesem Grund nicht ausgelassen werden. In einer publizierten Studie zum molekularen Nachweis der Salmonellen war letztendlich die Größe der Negativkontrollgruppen nicht ausreichend (NIELSEN, 2013). Eine andere Studie ergab eine geringere Sensitivität der verwendeten real-time PCR zum Nachweis von *S. Dublin* im Vergleich zur kulturellen Diagnostik (JENSEN et al., 2013). Für eine zeiteffiziente Untersuchung von Kotproben wäre dennoch eine Erstuntersuchung mittels Anreicherung und PCR auf *Salmonella* spp. mit anschließender kultureller Anzucht und Serovarbestimmung der positiven Proben effizient und denkbar (NIELSEN, 2013). Dieses Vorgehen ist zudem bereits aus der Lebensmittelmikrobiologie bekannt und hat sich dort bewährt (EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG, 2013).

Ferner ist eine Untersuchung von Serum- und Milchproben mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) möglich. Das Verfahren ist auf die Detektion von Immunglobulinen gegen Oberflächen-Lipopolysaccharide oder Geißeln von *S. Dublin* ausgerichtet (VELING et al., 2002). Bei einer Einzeltierbeprobung und der Matrix Milch beträgt die Sensitivität 77 bis 78 % und die Spezifität 65 bis 86 %, für Blutserum beträgt die Sensitivität 45 bis 74 % und die Spezifität 89 bis 100 % (VELING et al., 2000; NIELSEN et al., 2004b; NIELSEN, 2013). Dagegen kommt eine andere Studie zum Ergebnis, dass für Tiere im Alter zwischen 3 und 10 Monaten der Serum-ELISA verglichen mit den hier genannten Bedingungen die zuverlässigsten Ergebnisse liefert (NIELSEN, 2013). Offensichtlich schneidet jedoch die Beprobung von Tankmilch als Herdenscreening mit einer Sensitivität von 95 % und einer Spezifität von 96 % am besten ab. Ein Vorteil der Beprobung von Tankmilch ist dabei der geringe Arbeitsaufwand. Ein weiterer Vorteil der Untersuchung mittels ELISA ist, dass zudem auch Tiere entdeckt werden, die mit *S. Dublin* infiziert sind, aber zum Untersuchungszeitpunkt keine Bakterien ausscheiden (NIELSEN, 2013). Nachteile sind der Verdünnungseffekt hochpositiver Milchproben unter vielen negativen Proben und die Fokussierung auf laktierende Milchkühe (NIELSEN, 2013). Die Untersuchung von Kälbern unter 50 Tagen kann aufgrund maternaler Antikörper falsch positiv ausfallen, weshalb diese Altersgruppe letztendlich nur über die Kotuntersuchung diagnostiziert werden kann (NIELSEN et al., 2004a).

Zusammenfassend geht aus der Darstellung hervor, dass es zum Nachweis von *S. Dublin* beim Rind nicht ein Verfahren gibt, das am sensitivsten und spezifischsten für alle Altersgruppen eingesetzt werden kann. Deshalb muss das geeignetste Vorgehen ausgewählt werden unter der Berücksichtigung, dass ein gewisses Restrisiko für falsch negative Ergebnisse besteht (NIELSEN, 2013). Eine Kombination aus klinischen, bakteriologischen und serologischen Untersuchungen, je nach Fragestellung, erhöht die Wahrscheinlichkeit der Detektion von *S. Dublin* in einem Rinderbestand. So kann beispielsweise mittels klinischer Untersuchung eine Vorselektion der akut erkrankten Tiere stattfinden, die mit höherer Wahrscheinlichkeit *S. Dublin* im Kot ausscheiden (NIELSEN, 2013). Ebenfalls denkbar wäre ein serologisches Herdenscreening, gefolgt von

Kotuntersuchungen der serologisch positiven Tiere, um aktive Trägertiere aufzuspüren (NIELSEN, 2013). Auf diese Weise würden die relativ hohen Kosten für die kulturelle Diagnostik noch vergleichsweise gering gehalten (NIELSEN, 2013).

### **3. Prophylaxe und Therapie**

Möglichkeiten zur Prophylaxe und Therapie der Rindersalmonellose umfassen Immunisierung, Therapie mit Antibiotika, hygienische Maßnahmen oder sogar Merzung einzelner Dauerausscheider.

Grundsätzlich wäre die Impfung aller Rinder in Deutschland gegen Salmonellose wünschenswert, in Endemiegebieten wie Oberbayern sogar empfehlenswert (METHNER, 2020). In den letzten Jahren konnten mit ähnlicher Zielsetzung, hier der Sanierung von Beständen, umfassende Daten aus der Geflügelhaltung gewonnen werden. Legehennen, die mit einem lebenden Markerimpfstoff gegen Salmonellose immunisiert sind, entwickeln in den darauffolgenden Monaten keine Salmonellose mit Feldstämmen. Der Bestand ist demnach geschützt (HOFACRE et al., 2021). Nach Übertrag dieses Modells auf andere Nutztierarten könnte sich beispielsweise eine Herdenimmunität einstellen. In der Rinderpraxis jedoch werden Impfstoffe gegen Salmonellose häufig erst nach der Feststellung im Bestand eingesetzt (METHNER, 2020). Bei Rindern sind jedoch diverse Serovare relevant. Eine wirkungsvolle Impfung müsste demnach unterschiedliche Sero-Varianten enthalten. Der bisher bekannte Effekt der Immunisierung ist dennoch überzeugend. So verkürzt die Impfung gegen *S. Dublin* die Ausscheidungsdauer beim Einzeltier, reduziert die klinische Symptomatik und nicht zuletzt die Mortalität. Der wirtschaftliche Aspekt spielt dabei ebenfalls eine bedeutende Rolle (WRAY & DAVIES, 2000; STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VETERINÄRMEDIZIN, 2021). In Deutschland ist zwar ein oraler Kälberimpfstoff für *S. Dublin* zugelassen. Dieser ist aktuell jedoch nicht erhältlich (STÄNDIGE IMPFKOMMISSION VETERINÄRMEDIZIN, 2021; INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE, 2022). Die Wirkung eines Lebendimpfstoffs zur oralen Verabreichung an Kälber in der Praxis scheint abhängig von der Virulenz des Feldstammes zu sein. Gemäß publizierter Ergebnisse war bei einer geringen Anzahl von Kälbern mit klinischen Symptomen

kein signifikanter Unterschied zwischen der behandelten Gruppe und der, die nur ein Placebo erhalten hatte, erkennbar. Ob eine Schluckvakzine gegen Salmonellose bei Kälbern wirkungsvoll ist kann daher zum aktuellen Zeitpunkt nur eingeschränkt bewertet werden. Eine umfangreichere Datenerhebung ist zur Beantwortung dieser Fragestellung notwendig (HABING et al., 2011).

Gemäß diverser Studien wird nach Immunisierung mit verschiedenen Salmonellen-Serovaren eine Kreuzimmunität bei der Antikörperbildung gegen gemeinsame O-Gruppen festgestellt. Die Serovare Typhimurium und Dublin besitzen beide die Oberflächenantigene O1 und O12 (SMITH et al., 1984; KONRAD et al., 1994). Folglich wäre der experimentelle Einsatz von einem zugelassenen Impfstoff gegen *S. Typhimurium* bei *S. Dublin* positiven Tieren denkbar und bietet Raum für weitere Forschung (RANKIN et al., 1967).

Bestandsspezifische Impfstoffe, darunter auch von *S. Dublin* Isolaten, werden in Deutschland individuell hergestellt. Der Einsatz dieser inaktivierten immunologischen Tierarzneimittel ist bei Adulten und Jungtieren jedoch nicht immer erfolgreich (BARROW & WALLIS, 2000; METHNER, 2012). Dagegen bieten die Muttertierschutzimpfung und die Aufnahme von Kolostrum durch neonatale Kälber nachgewiesenermaßen einen hohen Schutz vor Infektion, auch mit *S. Dublin* und stellt damit eine sehr wichtige Komponente der Prophylaxe dar (NIELSEN et al., 2007).

Einen neueren Ansatz als die herkömmliche Schutzimpfung bietet die Remodulation der Immunantwort durch Einsatz von Zytokinen. Die Wirkweise ist dabei ähnlich wie bei einer therapeutischen oder passiven Impfung. Bei einer Infektion wandeln Salmonellen die T-Helferzellen (Th)1-Antwort in eine Th2-Antwort um, wodurch eine akute Entzündungsreaktion entsteht. Durch Gabe von Zytokinen wird die Th2-Antwort in eine Th1-Antwort zurückgewandelt. Bisher besteht dieser höchst interessante Ansatz allerdings nur in der Theorie. Konkrete Versuche an Tieren wurden noch nicht veröffentlicht (FOSTER et al., 2021).

Die Therapie der Salmonellose mit Antibiotika basiert auf Einzelfallentscheidungen (DIRKSEN, 2002). Bei der enteralen Form der Salmonellose sollten oral applizierte Antibiotika wohlüberlegt eingesetzt werden,

da die normale Darmflora geschädigt, die Ausscheidung von Salmonellen verlängert und Resistenzen hervorgerufen werden können. Bei einer Septikämie ist der Einsatz von intravenösen Präparaten möglich, wenn nicht sogar erforderlich (QUINN, 2002). Die Antibiotikatherapie der Salmonellose beim Rind birgt immer die Gefahr der Entstehung von Dauerausscheidern. Besonders groß scheint das Risiko nach Zukauf einzelner Tiere zu sein. Sind hingegen mehrere Kälber in einem Mastbetrieb klinisch erkrankt, so ist der Einsatz von Antibiotika zum Zwecke der Verhinderung von Leistungseinbußen und Verlusten gerechtfertigt (DIRKSEN, 2002). Im Falle der Verabreichung eines geeigneten Antibiotikums ist der frühestmögliche Behandlungsbeginn mit begleitendem Einsatz nichtsteroidaler Antiphlogistika entscheidend. Bei Diarrhoe ist eine symptomatische Behandlung mit Flüssigkeitsersatz und Ausgleich der Azidose erforderlich (DIRKSEN, 2002).

In jedem *S. Dublin* positiven Bestand müssen individuelle epidemiologische Analysen unter Berücksichtigung der Betriebsabläufe durchgeführt werden (METHNER, 2012). Gemäß publizierter Daten sind beispielsweise in Laufställen gehaltene Tiere gefährdeter für eine Salmonelleninfektion als Tiere in anderen Ställen (RICHARDSON & WATSON, 1971). Vermutlich sind Rinder in Laufställen besonders exponiert, da enger Kontakt zu vielen anderen Tieren besteht und die Ausscheidungen dieser Tiere auf den Laufgang konzentriert sind.

Eine erfolgreiche Bekämpfung von *S. Dublin* in einem Bestand erfordert ein effektives Hygieneregime (BOQVIST & VAGSHOLM, 2005; METHNER, 2020). Zugekaufte Tiere sollten zunächst 4 Wochen in einem Quarantänebereich abgesondert werden. Nach 3 Wochen empfiehlt es sich eine Salmonellendiagnostik aus Kotproben durchzuführen (WRAY & DAVIES, 2000). Vor der Entlassung aus der Quarantäne müssen Kotproben dreimal negativ getestet sein (QUINN, 2002). Erkrankte Tiere sollten bis zu 12 Wochen isoliert werden, um eine Salmonellenfreiheit nach Genesung sicherzustellen (WRAY & DAVIES, 2000; DIRKSEN, 2002). Dabei ist auch auf eine hygienische Trennung der Stallabteile, aller Gerätschaften und Arbeitskleidung zu achten (DIRKSEN, 2002). Biosicherheitsmaßnahmen sind essentiell um einen Betrieb vor einem Ausbruch der Rindersalmonellose zu schützen oder eine weitere Ausbreitung des Erregers im Bestand einzudämmen (KUDIRKIENE et al., 2020; RENAULT et al., 2021). Die

Ausbreitungswege von Salmonellen innerhalb eines Betriebes müssen langfristig unterbrochen werden. Besondere Beachtung sind der Reinigung und Desinfektion des Reproduktions- und Kälberbereiches eines Betriebes beizumessen (METHNER, 2012). Zusätzlich sollten Besatzdichte und weitere Stressfaktoren reduziert werden. Die Bewegung von Menschen, Fahrzeugen und Tieren sollte auf zugewiesene Bereiche beschränkt werden (QUINN, 2002). Des Weiteren ist eine unschädliche Beseitigung von Tierkörpern und kontaminiertem Einstreu zu beachten. Schließlich ist auch die Bekämpfung von Schädigern ein wichtiger Aspekt in der Prophylaxe von Krankheitserregern (FIELD, 1948; DIRKSEN, 2002; QUINN, 2002).

Stressfaktoren sind, wie publiziert, auch gesundheitliche Belastungen mit anderen Mikroorganismen oder Parasiten. In Herden, die einen Befall von Leberegelern aufwiesen wurde häufig auch gleichzeitig Salmonellose bei adulten Rindern beschrieben (RICHARDSON & WATSON, 1971; VAESSEN et al., 1998; DIRKSEN, 2002). Ein Zusammenhang ist jedoch bisher nicht belegt worden. Da eine Infestation durch *Fasciola* mit Weidegang verbunden ist, liegt der Verdacht nahe, dass Rinder auf Almen als gefährdet eingestuft werden könnten.

Jedoch sind individuelle Hygienekonzepte gerade auf Almen schwierig umzusetzen, da eine Umfriedung zum Beispiel durch ein festes Stallgebäude oder Weidezäune häufig nicht vorhanden ist (BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 2010). Auf den Almweiden kann es zu direktem Kontakt zwischen Rinderherden und Wildtieren beziehungsweise deren Ausscheidungen kommen. Zusätzlich kann *S. Dublin* über mehrere Monate auf Weiden und in Oberflächengewässern infektiös bleiben (FIELD, 1948). Wie in der Literatur beschrieben, sind Almen daher als Risikofaktor zur Verbreitung von Salmonellen anzusehen (ALLERBERGER et al., 2003; KLOSE et al., 2022). Um einen Eintrag in den heimatlichen Betrieb oder aus dem Betrieb heraus auf die Alm vorzubeugen, sollten vor dem Auf- und Abtrieb Kotproben auf Salmonellen untersucht werden (ALLERBERGER et al., 2003). Das Aufdecken von stillen Trägern, die durch den Stress beim Auf- oder Abtrieb vermehrt Salmonellen ausscheiden, zählt als prophylaktische Maßnahme. Nicht zuletzt deshalb sollten die Rinder zusätzlich nach dem Abtrieb für eine gewisse Zeit separat aufgestellt werden. Eine



mögliche Infektion kann in dieser Zeit aufgedeckt und eine potenzielle Verbreitung von Salmonellen im gesamten Bestand unterbunden werden.

Obwohl die aktuelle *in vivo* Studienlage zur Pathogenese von *S. Dublin* nicht sehr umfangreich ist, belegen die Zahlen dennoch, dass die vollständige Eradikation – gerade von *S. Dublin* – aus einem Bestand sehr schwierig ist. Die genaue Verbreitung zwischen Einzeltieren und Herden sowie bessere diagnostische Möglichkeiten und Ansatzpunkte für eine effektive Bekämpfung müssen daher weltweit noch genauer erforscht werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Salmonellose ist eine der bekanntesten Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier weltweit. Aufgrund diverser Erregerreservoirs in zahlreichen Tierarten und der vergleichsweise hohen Umweltstabilität des gramnegativen Bakteriums, ist eine vollständige Tilgung von *Salmonella* aus Beständen nur schwer möglich.

In vielen Ländern ist *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Dublin (*S. Dublin*) als Infektionserreger für das Rind bekannt, seltener jedoch für den Menschen. In den Jahren 2017 bis 2021 wurde diese Serovar im Süden des Bundeslands Bayern, als Ursache von 54 Ausbrüchen bei Tieren identifiziert. Die Erkrankung brach meist in Hausrindherden aus (n=50), aber auch in zwei Schweinebetrieben und in zwei Herden weiterer Rinderarten.

Im Rahmen der Ausbruchsuntersuchung wurden 88 *S. Dublin* Isolate aus diesen fünf Jahren näher analysiert. Die molekulare Genotypisierung ergab sieben verschiedene Cluster mit drei unterschiedlichen MLST-Sequenztypen und 16 untergeordneten cgMLST-basierten Komplextypen. Diese Diversität belegt, dass *S. Dublin* bereits über eine längere Zeitspanne in dem geografischen Raum Oberbayern prävalent ist. Zusätzliche und vergleichende Ergebnisse aus der epidemiologischen Untersuchung beweisen zudem, dass mindestens zwei Infektionsursprünge auf Almweiden in Oberbayern lagen, wo sich Tiere aus mehreren Beständen infiziert hatten.

Weiterhin ergab die Vollgenomanalyse der Ausbruchs isolate nur wenige Virulenzgene. Die *in vitro* Antibiotikaresistenztestung 71 bayerischer *S. Dublin* Isolate ergab vorwiegend sensible Phänotypen. Intermediäre und resistente Reaktionen wurden nur vereinzelt gegen jeweils eine einzige antibiotische Substanz gemessen. Analog dazu wurden *in silico* nur einzelne bekannte Resistenzgene detektiert.

Zusammenfassend weisen Ergebnisse aus der Vollgenomsequenzierung und epidemiologischen Untersuchungen auf *S. Dublin* Naturherde auf Almweiden in Oberbayern hin. Des Weiteren sollte aufgrund der hohen und permanenten Prävalenz von *S. Dublin* in Oberbayern dieser Regierungsbezirk als Endemiegebiet

eingestuft werden. In Folge dieser Feststellung empfiehlt es sich Rinder, die auf Almen sömmern, regelmäßig vor und nach der Almsaison auf Salmonellose zu untersuchen. Mögliche Prophylaxestrategien könnten zudem eine Impfung, Quarantänemaßnahmen und konsequente epidemiologische Begleituntersuchungen umfassen, um eine vermeidbare Ausbreitung von *S. Dublin* in Rinderherden zu verhindern.

## VI. SUMMARY

Salmonellosis is among the most common infectious diseases in man and animals worldwide. Due to broadly spread reservoirs in numerous animals and the comparably stable nature of the gram-negative bacterium, a complete elimination of *Salmonella* in cattle herds is difficult.

In many countries, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Dublin (*S. Dublin*) is responsible for clinical disease in cattle, but also in humans. In Southern Bavaria, Germany, the serovar was identified as causative agent for 54 outbreaks in herds between 2017 and 2021. Most of these emerged from cattle herds (n= 50), two occurred in pig farms and two in bovine livestock other than cattle.

Outbreak investigation was carried out on 88 *S. Dublin* strains isolated during the cited 5-year period. The genomic analysis revealed seven different clusters with three different MLST-based sequence types and 16 subordinate cgMLST-based complex types. This surprisingly high diversity of genotypes proves that *S. Dublin* has already been prevalent over a longer period in the geographical region of Upper Bavaria. Additional and comparative results yielded by the epidemiological investigation revealed that at least two origins of infection were geographically located on mountain pastures in Upper Bavaria where animals of different herd origin evidently became infected.

Furthermore, whole genome analysis of the outbreak isolates revealed only a few genes coding for bacterial virulence. *In vitro* antimicrobial susceptibility investigation of 71 Bavarian *S. Dublin* isolates yielded only sporadic intermediate and resistant reactions to single antibiotic substances. Similarly, only a few antimicrobial resistance genes were detected among the isolates.

As a conclusion, the results of the whole genome analysis and the epidemiological investigation suggest natural foci of *S. Dublin* on mountain pastures in Upper Bavaria. Consequently, Upper Bavaria should be classified as an endemic region due to the permanent and high prevalence of *S. Dublin*. Therefore, cattle should be screened for salmonellosis prior to and after transfer to mountain pastures.

Possible prophylaxis strategies may include vaccination, quarantine measures and a consistent epidemiological monitoring to prevent and curb the avoidable spread of *S. Dublin* in cattle herds.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Agren EC, Wahlstrom H, Vesterlund-Carlson C, Lahti E, Melin L, Soderlund R. Comparison of whole genome sequencing typing results and epidemiological contact information from outbreaks of *Salmonella* Dublin in Swedish cattle herds. *Infect Ecol Epidemiol* 2016; 6: 31782.

Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: D517-D25.

Alikhan NF, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet* 2018; 14: e1007261.

Allerberger F, Liesegang A, Grif K, Khaschabi D, Prager R, Danzl J, Höck F, Öttl J, P. Dierich M, Berghold C. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 2003; 153: 148-52.

Barrow P, Wallis T. Vaccination against *Salmonella* Infections in Food Animals: Rationale, Theoretical Basis and Practical Application. In: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray CaW, A., ed.: CABI Publishing, Oxon, UK 2000: 331.

Bäumler AJ, Tsois RM, Heffron F. Virulence Mechanisms of *Salmonella* and their Genetic Basis. In: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray CaW, A., ed.: CABI Publishing, Oxon, UK 2000: 57-72.

Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (2010) Alm-und Alpwirtschaft in Bayern.

Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere (HIT). 2021: <https://www3.hi-tier.de/HitCom/login.asp>. Zuletzt zugegriffen am 28. Februar 2022.

BfR (2020) Bundesinstitut für Risikobewertung. Next Generation Sequencing - Möglichkeiten und Grenzen beim Gesundheitsschutz von Mensch und Tier

Bharat A, Petkau A, Avery BP, Chen JC, Folster JP, Carson CA, Kearney A, Nadon C, Mabon P, Thiessen J. Correlation between Phenotypic and *In Silico* Detection of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* in Canada Using Staramr. *Microorganisms* 2022; 10: 292.

Boqvist S, Vagsholm I. Risk factors for hazard of release from *salmonella*-control restriction on Swedish cattle farms from 1993 to 2002. *Prev Vet Med* 2005; 71: 35-44.

Bundesministerium der Justiz (1991) Verordnung zum Schutz gegen die Salmonellose der Rinder (Rinder-Salmonellose-Verordnung) vom 14. November 1991 (BGBl. I S. 2118), zuletzt geändert durch Art. 2 vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388)

Carrique-Mas JJ, Willmington JA, Papadopoulou C, Watson EN, Davies RH. *Salmonella* infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. *Vet Rec* 2010; 167: 560-5.

Carroll LM, Wiedmann M, den Bakker H, Siler J, Warchocki S, Kent D, Lyalina S, Davis M, Sischo W, Besser T, Warnick LD, Pereira RV. Whole-Genome Sequencing of Drug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates from Dairy Cattle and Humans in New York and Washington States Reveals Source and Geographic Associations. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83

CLSI (2020) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA

Costa RA, Casaux ML, Caffarena RD, Macias-Rioseco M, Schild CO, Fraga M, Riet-Correa F, Giannitti F. Urocystitis and Ureteritis in Holstein Calves with Septicaemia Caused by *Salmonella enterica* Serotype Dublin. *J Comp Pathol* 2018; 164: 32-6.

DDBJ. DNA Databank of Japan. Informationen über DDBJ. 2022: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/about/index-e.html>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

de Knecht LV, Kudirkiene E, Rattenborg E, Sorensen G, Denwood MJ, Olsen JE, Nielsen LR. Combining *Salmonella* Dublin genome information and contact-tracing to substantiate a new approach for improved detection of infectious transmission routes in cattle populations. *Prev Vet Med* 2020; 181: 104531.

Dietz HH, Chriel M, Andersen TH, Jorgensen JC, Torpdahl M, Pedersen H, Pedersen K. Outbreak of *Salmonella* Dublin-associated abortion in Danish fur farms. *Can Vet J* 2006; 47: 1201-5.

Dirksen G (2002) Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Parey Buchverlag, Berlin. 1325DTU. Technical University of Denmark. SeqSero 1.2. 2021: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/SeqSero/>. Zuletzt zugegriffen am 20. Oktober 2021.



DTU. Technical University of Denmark. ResFinder 4.1. 2022a: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>. Zuletzt zugegriffen am 07. Februar 2022.

DTU. Technical University of Denmark. PlasmidFinder 2.1. 2022b: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>. Zuletzt zugegriffen am 04. Februar 2022.

EFSA. European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention Control. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal* 2022; 20: e07209.

EFSA Panel on Biological Hazards. Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F. Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA Journal* 2019; 17: e05898.

El Sayed F, Sapriel G, Fawal N, Gruber A, Bauer T, Heym B, Dupont C, Garchon HJ, Gaillard JL, Rottman M, Le Hello S. In-Host Adaptation of *Salmonella enterica* Serotype Dublin during Prosthetic Hip Joint Infection. *Emerg Infect Dis* 2018; 24: 2360-3.

Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, Grundman H, Hasman H, Holden MTG, Hopkins KL, Iredell J, Kahlmeter G, Koser CU, MacGowan A, Mevius D, Mulvey M, Naas T, Peto T, Rolain JM, Samuelsen O, Woodford N. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23: 2-22.

ENA. European Nucleotide Archive. Informationen über ENA. 2022a: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/about>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

ENA. European Nucleotide Archive. Abfrage *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin. 2022b: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/text-search?query=Salmonella%20enterica%20subsp.%20enterica%20serovar%20Dublin>. Zuletzt zugegriffen am 17. Juni 2022.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 12.0. 2022: <https://www.eucast.org/>. Zuletzt zugegriffen am 14. Juni 2022.

Europäisches Komitee für Normung (2013) DIN 10135:2013-05 Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Verfahren zum Nachweis von Salmonellen. Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin. 27

European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. ECDC. Annual Epidemiological Report for 2017. Stockholm 2020;

Eyler AB, M'Ikanatha N M, Xiaoli L, Dudley EG. Whole-genome sequencing reveals resistome of highly drug-resistant retail meat and human *Salmonella* Dublin. *Zoonoses Public Health* 2020; 67: 251-62.

Fang FC, Fierer J. Human infection with *Salmonella* dublin. *Medicine (Baltimore)* 1991; 70: 198-207.

Fantin B, Leggett J, Ebert S, Craig WA. Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against gram-negative *bacilli* in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1413-22.

Fenske GJ, Thachil A, McDonough PL, Glaser A, Scaria J. Geography Shapes the Population Genomics of *Salmonella enterica* Dublin. *Genome Biol Evol* 2019; 11: 2220-31.

Field HI. A survey of bovine salmonellosis in mid and west Wales. *Br Vet J* 1948; 104: 323-39.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995; 269: 496-512.

Florensa AF, Kaas RS, Clausen P, Aytan-Aktug D, Aarestrup FM. ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genom* 2022; 8

Foster N, Tang Y, Berchieri A, Geng S, Jiao X, Barrow P. Revisiting Persistent *Salmonella* Infection and the Carrier State: What Do We Know? *Pathogens* 2021; 10

Friedrich-Loeffler-Institut. TierSeuchenNachrichten-System (TSN). 2022: <https://tsn.fli.de/Auth/Forms/Login.aspx?ReturnUrl=%2f>. Zuletzt zugegriffen am 28. Februar 2022.

Garcia-Soto S, Tomaso H, Linde J, Methner U. Epidemiological Analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin in German Cattle Herds Using Whole-Genome Sequencing. *Microbiol Spectr* 2021: e0033221.

Gillians JA, Palmer HW, Dyte PH. Follicular dermatitis caused by *Salmonella* dublin. *Med J Aust* 1982; 1: 390-1. Grimont PA, Weill F-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella: Paris, France 2007; 9: 1-166.

Habing GG, Neuder LM, Raphael W, Piper-Youngs H, Kaneene JB. Efficacy of oral administration of a modified-live *Salmonella* Dublin vaccine in calves. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238: 1184-90.

Harvey RR, Friedman CR, Crim SM, Judd M, Barrett KA, Tolar B, Folster JP, Griffin PM, Brown AC. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Dublin Infections among Humans, United States, 1968-2013. *Emerg Infect Dis* 2017; 23: 1493-501.

Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Molbak K. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *BMJ* 2003; 326: 357.

Hinton M. *Salmonella* dublin abortion in cattle: studies on the clinical aspects of the condition. *Br Vet J* 1974; 130: 556-63.

Hinton M. The diagnosis of *salmonella* abortion in cattle with particular reference to *Salmonella* dublin. A review. *J Hyg (Lond)* 1977; 79: 25-38.

Hirose K, Ezaki T, Miyake M, Li T, Khan AQ, Kawamura Y, Yokoyama H, Takami T. Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella* typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 147: 259-65.

Hofacre CL, Rosales AG, Costa MD, Cookson K, Schaeffer J, Jones MK. Immunity and Protection Provided by Live Modified Vaccines Against Paratyphoid *Salmonella* in Poultry-An Applied Perspective. *Avian Dis* 2021; 65: 295-302.

House JK, Smith BP, Dilling GW, Roden LD. Enzyme-linked immunosorbent assay for serologic detection of *Salmonella* dublin carriers on a large dairy. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1391-9.

Ibrahim GM, Morin PM. *Salmonella* serotyping using whole genome sequencing. *Frontiers in microbiology* 2018; 9: 2993.

INSDC. International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Informationen über INSDC. 2022: <https://www.insdc.org/>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig. Vetidata - Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. 2022: <https://vetidata.de/>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

Institute of Pathogen Biology, CAMS&PUMC. Virulence Factor Database (VFDB). 2021: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>. Zuletzt zugegriffen am 03. Februar 2022.

Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World* 2019; 12: 504-21.

Jensen AN, Nielsen LR, Baggesen DL. Use of real-time PCR on faecal samples for detection of sub-clinical *Salmonella* infection in cattle did not improve the detection sensitivity compared to conventional bacteriology. *Vet Microbiol* 2013; 163: 373-7.

Khan AA, Nawaz MS, Khan SA, Cerniglia CE. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 182: 355-60.

Klose C, Scuda N, Ziegler T, Eisenberger D, Hanczaruk M, Riehm JM. Whole-Genome Investigation of *Salmonella* Dublin Considering Mountain Pastures as Reservoirs in Southern Bavaria, Germany. *Microorganisms* 2022; 10

Konrad H, Smith BP, Dilling GW, House JK. Production of *Salmonella* serogroup D (O9)-specific enzyme-linked immunosorbent assay antigen. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1647-51.

Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Graevenitz Av, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H (2004) Zoonosen Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

Kudirkiene E, Sorensen G, Torpdahl M, de Knecht LV, Nielsen LR, Rattenborg E, Ahmed S, Olsen JE. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Dublin in Cattle and Humans in Denmark, 1996 to 2016: a Retrospective Whole-Genome-Based Study. *Appl Environ Microbiol* 2020; 86

Lambert MA, Smith SG. The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* 2008; 8: 142.

Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery DW. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 2015; 15: 141-61.

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Cassar CA, Clifton-Hadley FA, Lindsay EA, Threlfall EJ, Chappell SA, Davies RH. Investigation of the genetic diversity among isolates of *Salmonella enterica* serovar Dublin from animals and humans from England, Wales and Ireland. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 732-44.

Looney RJ, Steigbigel RT. Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *J Lab Clin Med* 1986; 108: 506-16.

Mangat CS, Bekal S, Irwin RJ, Mulvey MR. A Novel Hybrid Plasmid Carrying Multiple Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Salmonella enterica* Serovar Dublin. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61

Mangat CS, Bekal S, Avery BP, Cote G, Daignault D, Doualla-Bell F, Finley R, Lefebvre B, Bharat A, Parmley EJ, Reid-Smith RJ, Longtin J, Irwin RJ, Mulvey MR, Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance Public Health P. Genomic Investigation of the Emergence of Invasive Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Dublin in Humans and Animals in Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63

Maynaud G, Pourcher AM, Ziebal C, Cuny A, Druilhe C, Steyer JP, Wery N. Persistence and Potential Viable but Non-culturable State of Pathogenic Bacteria during Storage of Digestates from Agricultural Biogas Plants. *Front Microbiol* 2016; 7: 1469.

McDonough PL, Fogelman D, Shin SJ, Brunner MA, Lein DH. *Salmonella enterica* serotype Dublin infection: an emerging infectious disease for the northeastern United States. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2418-27.

Methner U. Salmonellose der Rinder. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 2012; 4: 1-4.

Methner U. Salmonellose der Rinder. In: *Tiergesundheitsjahresbericht 2019 Greifswald - Insel Riems: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit 2020: 92-8.*

Methner U. Salmonellose der Rinder. In: *Tiergesundheitsjahresbericht 2020 Greifswald - Insel Riems: Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit 2021: 83-9.*

Milstein M. *Salmonella* dublin septicemia in a Scottish terrier recently imported from England. *Can Vet J* 1975; 16: 179-80.

Mohammed M, Delappe N, O'Connor J, McKeown P, Garvey P, Cormican M. Whole genome sequencing provides an unambiguous link between *Salmonella* Dublin outbreak strain and a historical isolate. *Epidemiol Infect* 2016; 144: 576-81.

Mohammed M, Cormican M. Whole genome sequencing provides insights into the genetic determinants of invasiveness in *Salmonella* Dublin. *Epidemiol Infect* 2016; 144: 2430-9.

Mohammed M, Le Hello S, Leekitcharoenphon P, Hendriksen R. The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 544.

Mohler JRB, J.S. Report on an Enzootic among Cattle caused by a *Bacillus* of the Enteritidis Group. In: Nineteenth Annual Report of the Bureau of Animal Industry for the year 1902. Agriculture USDo, ed.: Government Printing Office, Washington 1903: 297-331.

Nazer AH, Osborne AD. Experimental *Salmonella* dublin infection in calves. *Br Vet J* 1977; 133: 388-98.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Informationen über NCBI. 2022: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/programs/>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

Nielsen LR, Schukken YH, Grohn YT, Ersboll AK. *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. *Prev Vet Med* 2004a; 65: 47-62.

Nielsen LR, Toft N, Ersboll AK. Evaluation of an indirect serum ELISA and a bacteriological faecal culture test for diagnosis of *Salmonella* serotype Dublin in cattle using latent class models. *J Appl Microbiol* 2004b; 96: 311-9.



Nielsen LR, van den Borne B, van Schaik G. *Salmonella* Dublin infection in young dairy calves: transmission parameters estimated from field data and an SIR-model. *Prev Vet Med* 2007; 79: 46-58.

Nielsen LR. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol* 2013; 162: 1-9.

Nielsen TD, Kudahl AB, Ostergaard S, Nielsen LR. Gross margin losses due to *Salmonella* Dublin infection in Danish dairy cattle herds estimated by simulation modelling. *Prev Vet Med* 2013; 111: 51-62.

Okido T, Kodama Y, Mashima J, Kosuge T, Fujisawa T, Ogasawara O. DNA Data Bank of Japan (DDBJ) update report 2021. *Nucleic Acids Res* 2022; 50: D102-D5.

Olsen JE, Baggesen DL, Nielsen BB, Larsen HE. The prevalence of plasmids in Danish bovine and human isolates of *Salmonella* dublin. *APMIS* 1990; 98: 735-40.

Otter A. Cattle abortions update. *Vet Rec* 2020; 186: 597-8.

Parker CT, Huynh S, Alexander A, Oliver AS, Cooper KK. Genomic Characterization of *Salmonella* typhimurium DT104 Strains Associated with Cattle and Beef Products. *Pathogens* 2021; 10

Paudyal N, Pan H, Elbediwi M, Zhou X, Peng X, Li X, Fang W, Yue M. Characterization of *Salmonella* Dublin isolated from bovine and human hosts. *BMC Microbiol* 2019; 19: 226.

Philbey AW, Mather HA, Gibbons JF, Thompson H, Taylor DJ, Coia JE. Serovars, bacteriophage types and antimicrobial sensitivities associated with salmonellosis in dogs in the UK (1954-2012). *Vet Rec* 2014; 174: 94.

Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, Barron A, Gaora PO, Chabalgoity JA, Thanky N, Scholes C, Thomson N, Quail M, Parkhill J, Dougan G. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol* 2003; 185: 5055-65.

Pilla G, Tang CM. Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16: 484-95.

Popa GL, Papa MI. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs* 2021; 11: 88-96.

Pullinger GD, Paulin SM, Charleston B, Watson PR, Bowen AJ, Dziva F, Morgan E, Villarreal-Ramos B, Wallis TS, Stevens MP. Systemic translocation of *Salmonella enterica* serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2. *Infect Immun* 2007; 75: 5191-9.

Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum S, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, Wertheim HFL. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev* 2017; 30: 1015-63.

Quinn PJM, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 536

Ranjbar Malidareh N, Firouzi S, Ranjbar Malidareh N, Habibi H. In vitro and in vivo susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens. *Comparative clinical pathology* 2013; 22: 1065-8.

Rankin JD, Taylor RJ, Newman G. The protection of calves against infection with *Salmonella typhimurium* by means of a vaccine prepared from *Salmonella dublin* (strain 51). *Vet Rec* 1967; 80: 720-6.

Renault V, Humblet MF, Pham PN, Saegerman C. Biosecurity at Cattle Farms: Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats. *Pathogens* 2021; 10

Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 2018; 4: 482-501.

Richardson A, Watson WA. A contribution to the epidemiology of *Salmonella* dublin infection in cattle. *Br Vet J* 1971; 127: 173-83.

Richardson A, Fawcett AR. *Salmonella* dublin infection in calves: the value of rectal swabs in diagnosis and epidemiological studies. *Br Vet J* 1973; 129: 151-6.

Richardson A. Salmonellosis in cattle. *Vet Rec* 1975; 96: 329-31.

Ridom Bioinformatics. Ridom SeqSphere+. 2022: <https://www.ridom.de/seqsphere/>. Zuletzt zugegriffen am 22. Mai 2022.

Robert Koch-Institut. Salmonellose. In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018: Robert Koch-Institut, Berlin 2019: 210-3.

Robert Koch-Institut. Salmonellose. In: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2020: Robert Koch-Institut, Berlin 2021a: 179-82.

Robert Koch-Institut. SurvStat@RKI 2.0. 2021b: <https://survstat.rki.de>. Zuletzt zugegriffen am 24. Oktober 2021.

Rycroft AN. Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*. In: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray CaW, A., ed.: CABI Publishing, Oxon, UK 2000: 19-33.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265: 687-95.

Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007; 132: 1820-33.

Segall T, Lindberg AA. Experimental oral *Salmonella* dublin infection in calves. A bacteriological and pathological study. *Zentralbl Veterinarmed B* 1991; 38: 169-85.

Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P (2015) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 10., aktualisierte Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. 672

Sergeant E, Perkins N (2015) *Epidemiology for Field Veterinarians: An Introduction*, 1 edn. CABI Publishing, Oxon, UK. 320

Smith BP, Reina-Guerra M, Stocker BA, Hoiseth SK, Johnson E. Aromatic-dependent *Salmonella* dublin as a parenteral modified live vaccine for calves. *Am J Vet Res* 1984; 45: 2231-5.

Srednik ME, Lantz K, Hicks JA, Morningstar-Shaw BR, Mackie TA, Schlater LK. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States. *PLoS One* 2021; 16: e0249617.

Stadtlander CT. One Health: people, animals, and the environment. *Infect Ecol Epidemiol* 2015; 5: 30514.

Ständige Impfkommision Veterinärmedizin (2021) Leitlinie zur Impfung von Rindern und kleinen Wiederkäuern, 2 edn. Ständige Impfkommision Veterinärmedizin, Greifswald. 118

Stranneheim H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnol J* 2012; 7: 1063-73.

Uelze L, Becker N, Borowiak M, Busch U, Dangel A, Deneke C, Fischer J, Flieger A, Hepner S, Huber I, Methner U, Linde J, Pietsch M, Simon S, Sing A, Tausch SH, Szabo I, Malorny B. Toward an Integrated Genome-Based Surveillance of *Salmonella enterica* in Germany. *Front Microbiol* 2021; 12: 626941.

Ung A, Baidjoe AY, Van Cauteren D, Fawal N, Fabre L, Guerrisi C, Danis K, Morand A, Donguy MP, Lucas E, Rossignol L, Lefevre S, Vignaud ML, Cadel-Six S, Lailier R, Jourdan-Da Silva N, Le Hello S. Disentangling a complex nationwide *Salmonella* Dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016. *Euro Surveill* 2019; 24

Vaessen MA, Veling J, Frankena K, Graat EA, Klunder T. Risk factors for *Salmonella* dublin infection on dairy farms. *Vet Q* 1998; 20: 97-9.

van Belkum A, Dunne WM, Jr. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2018-24.

van Duijkeren E, Schink AK, Roberts MC, Wang Y, Schwarz S. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiol Spectr* 2018; 6

Veling J, van Zijderveld FG, van Zijderveld-van Bemmelen AM, Barkema HW, Schukken YH. Evaluation of three newly developed enzyme-linked immunosorbent assays and two agglutination tests for detecting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar dublin infections in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4402-7.

Veling J, Barkema HW, van der Schans J, van Zijderveld F, Verhoeff J. Herd-level diagnosis for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin infection in bovine dairy herds. *Prev Vet Med* 2002; 53: 31-42.

Vignaud ML, Cherchame E, Marault M, Chaing E, Le Hello S, Michel V, Jourdan-Da Silva N, Lailler R, Brisabois A, Cadel-Six S. MLVA for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin: Development of a Method Suitable for Inter-Laboratory Surveillance and Application in the Context of a Raw Milk Cheese Outbreak in France in 2012. *Front Microbiol* 2017; 8: 295.

Wallis TS, Paulin SM, Plested JS, Watson PR, Jones PW. The *Salmonella* dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect Immun* 1995; 63: 2755-61.

Warwick Medical School. EnteroBase 2022: <https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>. Zuletzt zugegriffen am 27. Mai 2022.

Whithworth J. Denmark to toughen *Salmonella* Dublin rules. *Food Safety News*: 2021: <https://www.foodsafetynews.com/2021/02/denmark-to-toughen-salmonella-dublin-rules/#:~:text=Currently%2C%20about%2010%20percent%20of,2002%20to%2025%20in%202017>. Zuletzt zugegriffen am 24. Juni 2022.

Williams E. Veterinary surgeons as vectors of *Salmonella* dublin. *Br Med J* 1980; 280: 815-8.

World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Genf, Schweiz. 256

Wray C, Davies RH. *Salmonella* Infections in Cattle. In: *Salmonella* in Domestic Animals. Wray CaW, A., ed.: CABI Publishing, Oxon, UK 2000: 169-90.

Yoon EJ, Jeong SH. MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Antibiotics* (Basel) 2021;

Zhang S, Yin Y, Jones MB, Zhang Z, Deatherage Kaiser BL, Dinsmore BA, Fitzgerald C, Fields PI, Deng X. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. J Clin Microbiol 2015; 53: 1685-92.

Zhang S, den Bakker HC, Li S, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, Lauer AC, Fields PI, Deng X. SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. Appl Environ Microbiol 2019; 85

## VIII. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer für die Betreuung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Julia Riehm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Auf dein Engagement und konstruktive Hilfestellungen ist immer Verlass.

Danke an Herrn Dr. Reiner Faul für die verständnisvolle Unterstützung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Das Paper wäre ohne die motivierte und stets gut gelaunte Mitarbeit von Dr. Nelly Scuda, Dr. Matthias Hanczaruk, David Eisenberger und Tobias Ziegler in der Form nicht entstanden. Vielen Dank für eure vielen Denkanstöße, neuen Ideen und für die tatkräftige Unterstützung.

Ich danke meinen Kolleginnen Dr. Kerstin Boll, Dr. Nina Kaestner und Dr. Anna Rettinger dafür, dass ihr mir stets den Rücken freigehalten habt. Eure aufmunternden Worte und euer offenes Ohr haben mir in dieser Zeit sehr geholfen.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mama für das Korrekturlesen.