

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

---

**Vergleichende Charakterisierung der Salmonelleninfektion des  
Schweins mit den *Salmonella enterica*-Serovaren Typhimurium,  
Derby und Infantis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Martin Leffler  
aus Kirchheim/ Thüringen

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Professor Dr. Uwe Rösler

Gutachter:

1. Gutachter: Professor Dr. Uwe Rösler,  
Institut für Tier- und Umwelthygiene  
der Freien Universität Berlin, Berlin
  
2. Gutachter: Professor Dr. Ernst Lücker  
Institut für Lebensmittelhygiene  
der Universität Leipzig, Leipzig
  
3. Gutachter: Professor Dr. Hans-Joachim Selbitz  
IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau

Tag der Verteidigung: 25.11.2008

*Im  
Andenken  
an meine  
Mutter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Taxonomie des Genus <i>Salmonella</i></b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Physiologie des Genus <i>Salmonella</i></b> .....	<b>6</b>
2.2.1 Morphologie und Biochemie von <i>Salmonella</i> .....	6
2.2.2 Virulenzfaktoren von <i>Salmonella</i> .....	6
<b>2.3 Epidemiologie des Genus <i>Salmonella</i></b> .....	<b>8</b>
2.3.1 Epidemiologie der Salmonellose des Menschen.....	9
2.3.2 Epidemiologie der Salmonelleninfektion des Schweins.....	11
<b>2.4 Pathogenese porziner Salmonellosen</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5 Klinik porziner Salmonellosen</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6 Diagnostik von <i>Salmonella</i> ssp.</b> .....	<b>16</b>
2.6.1 Kultureller Nachweis .....	16
2.6.2 Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.6.2 Serologischer Nachweis.....	18
<b>3 Tiere, Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Material</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Verwendete Bakterienstämme .....	22
3.2.2 Probenmaterial aus experimentell infizierten Schweinen .....	22
3.2.3 Entnahme der Blutproben .....	23
3.2.4 Voranreicherungsmedien und Nährböden für die kulturelle Diagnostik .....	23
<b>3.3 Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.3.1 Infektionsversuche.....	24
3.3.2 Bakteriologische Untersuchung.....	25
3.3.2.1 Kotproben .....	25
3.3.2.2 Organ- und Gewebeproben .....	26
3.3.3 Serologische Diagnostik .....	26
3.3.4 Statistische Auswertung.....	28
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Klinische Untersuchung</b> .....	<b>29</b>

<b>4.2 Ausscheidung der Challengestämme.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Organbesiedlung der Challengestämme .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Humorale Immunantwort .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Differentialblutbild .....</b>	<b>40</b>
4.5.1 Gesamtleukozyten .....	40
4.5.2 Stabkernige neutrophile Granulozyten .....	41
4.5.3 Lymphozyten .....	42
4.5.4 Monozyten .....	44
<b>4.6 Blutchemie .....</b>	<b>45</b>
4.6.1 Natriumgehalt .....	46
4.6.2 Kaliumgehalt .....	47
4.6.3 Chloridgehalt .....	48
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Klinik.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Ausscheidung des Challengestammes und Kolonisierungsraten .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Serologische Untersuchung .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4 Vergleich der Differentialblutbilder.....</b>	<b>56</b>
5.4.1 Gesamtleukozytenzahl.....	57
5.4.2 Neutrophile Granulozyten .....	57
5.4.3 Lymphozyten .....	58
5.4.4 Monozyten .....	58
<b>5.5 Blutchemie .....</b>	<b>59</b>
5.5.1 Natriumgehalt .....	59
5.5.2 Chloridgehalt .....	59
<b>5.6 Schlussfolgerung.....</b>	<b>60</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>63</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Infektionsstämme .....	22
Tabelle 2. Untersuchte Organ- und Gewebeprobe n .....	23
Tabelle 3. Eingesetzte Serum- bzw. Konjugatverdün nungen .....	27

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Taxonomie der Gattung <i>Salmonella</i> nach Popoff et al. (2004).....	4
<b>Abbildung 2.</b> Allgemeiner Aufbau der Infektionsversuche am Schwein mit verschiedenen <i>Salmonella</i> - Serovaren. ....	21
<b>Abbildung 3.</b> Zusammenfassung der Mittelwerte des klinischen Scores nach experimenteller Infektion der Schweine mit <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i> DT104 und <i>S. Derby</i> .. ....	30
<b>Abbildung 4.</b> Verlauf der Inneren Körpertemperaturen nach experimenteller Infektion der Schweine mit <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i> DT104 und <i>S. Derby</i> . ....	30
<b>Abbildung 5.</b> Durchfallsymptomatik nach experimenteller Infektion der Schweine mit <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i> DT104 und <i>S. Derby</i> . ....	31
<b>Abbildung 6.</b> Allgemeinbefinden nach experimenteller Infektion der Schweine mit <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i> DT104 und <i>S. Derby</i> .. ....	32
<b>Abbildung 7.</b> Futteraufnahme nach experimenteller Infektion der Schweine mit <i>S. Infantis</i> , <i>S. Typhimurium</i> DT104 und <i>S. Derby</i> . ....	32
<b>Abbildung 8.</b> Salmonellen-Ausscheidungsrate der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe in den Faeces nach Anreicherung. ....	34
<b>Abbildung 9.</b> Quantitative Ausscheidung des Infektionsstammes der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und <i>S. Derby</i> -Gruppe.....	34
<b>Abbildung 10.</b> Kolonisierungsrate des Infektionsstammes bei der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und <i>S. Derby</i> -Gruppe.....	35
<b>Abbildung 11.</b> Quantitativer Salmonellennachweis des jeweiligen Infektionsstammes bei der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und <i>S. Derby</i> -Gruppe. ....	36
<b>Abbildung 12.</b> Salmonellen-spezifische IgM-Antikörperaktivitäten der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und <i>S. Derby</i> -Gruppe im Blutserum.....	38
<b>Abbildung 13.</b> Salmonellen- spezifische IgG- Antikörperaktivitäten der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> - Gruppe im Blutserum.....	39
<b>Abbildung 14.</b> Gesamtleukozytenzahl der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe im Blutplasma während des Experiments.....	40
<b>Abbildung 15.</b> Anteil der stabkernigen neutrophilen Granulozyten der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe am Differentialblutbild während des Experiments.....	42

<b>Abbildung 16.</b> Anteil der Lymphozyten der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe am Differentialblutbild während des Experiments... 43	43
<b>Abbildung 17.</b> Anteil der Monozyten der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe am Differentialblutbild während des Experiments... 44	44
<b>Abbildung 18.</b> Natriumgehalt der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe im Blutplasma während des Experiments..... 46	46
<b>Abbildung 19.</b> Kaliumgehalt der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe im Blutplasma während des Experiments..... 47	47
<b>Abbildung 20.</b> Chloridgehalt der <i>S. Infantis</i> -Gruppe, der <i>S. Typhimurium</i> DT104-Gruppe und der <i>S. Derby</i> -Gruppe im Blutplasma während des Experiments..... 48	48

## Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin- Monophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <b>D</b> esoxyribo- <b>n</b> ucleic- <b>a</b> cid)
EDTA	Ethylendiammin-tetraacetat
ELISA	<b>E</b> nzyme- <b>L</b> inked- <b>I</b> mmuno- <b>S</b> orbent- <b>A</b> ssay
EU	ELISA Einheiten (ELISA units)
g	Gramm
h	Stunden
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin(isotyp) A
IgG	Immunglobulin(isotyp) G
IgM	Immunglobulin(isotyp) M
KbE, CFU	Kolonie bildende Einheit, Colony forming unit
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände-, und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharid
Ln./Lnn.	Lymphonodus/ Lymphonodi
log	Logarithmus, logarithmisch
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minuten
nm	Nanometer
NRL- Salm	Nationales Referenzlabor für Salmonellen
o.b.B.	ohne besonderen Befund
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung ( <b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <b>P</b> olymerase- <b>c</b> hain- <b>r</b> eaction)

rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure ( <b>ribosomal Ribo-nucleic-acid</b> )
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TMB	3,3,5,5- Tetramethylbenzidin
U/min, rpm	Umdrehungen pro Minute ( <b>rounds per minute</b> )
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
(vol/vol)	Volumenprozent

## 1 Einleitung

Salmonellen gelten in Deutschland neben *Campylobacter*-Spezies zu den bedeutendsten bakteriellen Lebensmittelvergiftern. Im Jahr 2007 wurden laut §7 des Infektionsschutzgesetzes etwa 55.400 Fälle von Gastroenteritiden aufgrund einer Salmonelleninfektion gemeldet (ANONYMUS 2008a). Im Jahr 2005 waren die am häufigsten isolierten Serovare von *Salmonella enterica* *S. Enteritidis* (68 %), gefolgt von *S. Typhimurium* (25 %), sowie in weitem Abstand von *S. Bovismorbificans* und *S. Infantis* (um 1 %), *S. Virchow* (0,4 %) und *S. Derby* (0,3%) (ANONYMUS 2006).

Schweine sind als primäre Quelle von Salmonelleninfektionen des Menschen zwar schon lange bekannt, aber erst im letzten Jahrzehnt ist ihnen in diesem Zusammenhang stärkere Aufmerksamkeit gewidmet worden. Besonders klinisch-inapparent infizierte Schlachtschweine stellen ein ernst zu nehmendes Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

Man geht davon aus, dass über 20% der Fälle von humaner *Enteritis infectiosa*, hervorgerufen durch Salmonellen, auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückzuführen sind (STEINBACH u. HARTUNG 1999). Zum Schutz der Verbraucher ist deshalb die Schaffung einer Qualitätssicherung entlang der gesamten Lebensmittelkette („Stable to Table“-Konzept) einschließlich eines ständigen Monitorings über die Verbreitung von Salmonellen erforderlich. Dazu wurde am 13. März 2007 eine neue „Schweine- Salmonellenverordnung“ vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz verabschiedet. Danach sollen Betriebe hinsichtlich ihrer Serumprävalenz in drei Kategorien eingeteilt und später entsprechend sanktioniert werden (ANONYMUS 2007).

Bisherige Infektionsversuche an Schweinen wurden meist mit *S. Typhimurium* durchgeführt, da diese Serovar beim Schwein am häufigsten isoliert wird und aufgrund ihrer Virulenz große Bedeutung für den Menschen hat. Über die Serovare *Infantis* und *Derby* ist beim Schwein hingegen nur wenig bekannt. Vergangenen Studien zufolge sind sie als gering virulent und kaum invasiv einzuschätzen. Jedoch wurden dafür nur Einzeltiere und zum Teil nicht natürliche Infektionsrouten verwendet, was die Verallgemeinerung dieser Aussagen nicht zulässt. In den letzten Jahren wurden die Serovare *Infantis* und *Derby* jedoch des Öfteren beim Schwein isoliert und können auch beim Menschen schwere klinische Erkrankungen auslösen, was diese Serovare neben *S. Typhimurium* zunehmend bedeutsam macht.

Ziel dieser Arbeit ist daher eine vergleichende Charakterisierung der akuten Salmonelleninfektion mit *S. Infantis*, *S. Typhimurium* und *S. Derby* am experimentell infizierten Schwein bei natürlicher Infektionsroute. Hierzu sollen das klinische Bild, das qualitative und quantitative Ausscheidungsverhalten, die qualitative und quantitative Organbesiedlung, die Serokonversion bezüglich der unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen IgA, IgG und IgM, die unterschiedlichen Auswirkungen auf das Differentialblutbild sowie ausgewählte blutchemischer Parameter innerhalb einer Woche *post infectionem* herangezogen und miteinander verglichen werden. Die ermittelten Daten sollen weitere Erkenntnisse über die Pathogenese von Salmonelleninfektionen der wirtschaftlich und gesundheitlich bedeutsamen Spezies Schwein erbringen, um so einen verbesserten Verbraucherschutz zu gewährleisten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Taxonomie des Genus *Salmonella*

Bereits 1880 wurde der Erreger des „Schweintyphus“ (*Salmonella typhi*) durch Eberth mikroskopisch nachgewiesen. Er wurde vorerst jedoch unter einem anderen Gattungsnamen geführt. Erst 1900 wurde dann von Lignieres der von Salmon 1885 beschriebene Hogcholera-Bacillus als *Salmonella choleraesuis* benannt, was schließlich zur Gattungsbezeichnung der Salmonellen führte (SELBITZ 2006).

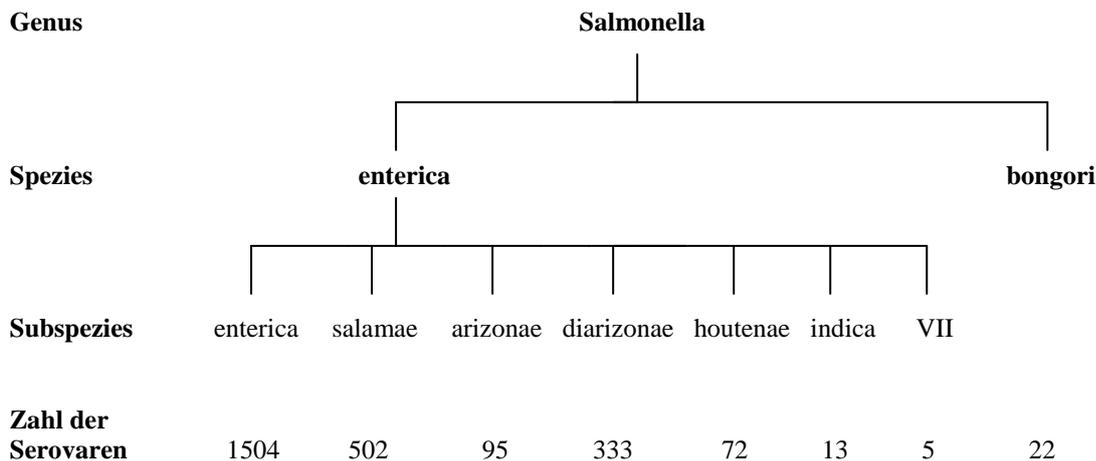
Die Salmonellen werden dem Stamm *Proteobacteria* des Reiches *Bacteria* zugeordnet. Da jedoch Untersuchungen der rRNA Unterschiede ergaben, wurde innerhalb des Stammes *Proteobacteria* die Klasse *Gamma-Proteobacteria* eingeführt, zu der die *Enterobacteriaceae* mit den Salmonellen zählen (BRENNER et al. 2005).

Die Gruppe der Salmonellen umfasst derzeit über 2500 Serovaren die meist aus Vertebraten isoliert werden konnten (POPOFF et al. 2004). Die Taxonomie der Salmonellen ist sehr komplex und wurde in der Vergangenheit häufig geändert. In der Anfangsphase wurde jede *Salmonella*-Art nach klinischen Gesichtspunkten benannt, z. B. *Salmonella typhi-murium* (Mäusetyphus). KAUFFMANN betrachtete (1941) alle bekannten *Salmonella*-Isolate als eigene Spezies. Im Jahre 1966 unterteilte KAUFFMANN schließlich das Genus *Salmonella* dann aufgrund unterschiedlicher biochemischer Eigenschaften in vier Subgenera, wobei jede Serovar als Spezies betrachtet wurde. REEVES et al. (1989) machten dann den Vorschlag, die Spezies *Salmonella* in zwei Subspezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* einzuteilen. Im Gegensatz dazu differenzierten POPOFF et al. (1994) zwei andere *Salmonella*-Spezies: *Salmonella choleraesuis* und *Salmonella bongori*. Da die Bezeichnung der Spezies *S. Choleraesuis* durch die gleichzeitige Benennung einer Serovar mit diesem Namen zu Verwirrung Anlass gab, wurde von LE MINOR und POPOFF (1987) der präzisierende Vorschlag gemacht, sowohl die Spezies als auch die Subspezies *S. choleraesuis* unter der Speziesbezeichnung *Salmonella enterica* zusammenzufassen (EUZEBY 1999).

Nach der derzeit gültigen Nomenklatur gliedert sich die Gattung *Salmonella* in die Spezies *S. enterica* und *S. bongori*. Im Jahr 2004 wurde noch eine dritte Spezies, *S. subterranea*, diskutiert, jedoch konnte sich durch molekularbiologische Untersuchungen die Existenz dieser *Salmonella*-Spezies nicht bestätigen (MALORNY 2008). Bei *S. enterica* unterscheidet

man noch die sieben Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* und die Subspezies VII, welche sich wiederum in derzeit mehr als 2400 Serovaren untergliedern (POPOFF 2004).

**Abbildung 1** gibt eine Übersicht zur derzeitigen *Salmonella*-Taxonomie wieder.



**Abbildung 1.** Taxonomie der Gattung *Salmonella* nach Popoff et al. (2004)

*S. enterica* ssp. *enterica* stellt für die Säuger die bedeutendste Subspezies dar, während die Subspezies *arizonae* und *diarizonae* überwiegend bei Reptilien isoliert werden konnten. Die verbleibenden Subspezies sowie die Spezies *bongori* sind hauptsächlich in der Umwelt verbreitet, ohne dass sie als klinisch relevant gelten.

Allen *Enterobacteriaceae* ist gemein, dass sie drei unterschiedliche Antigengruppen aufweisen. Zum einen gibt es O-Antigene, hitzestabile, formaldehydunbeständige Lipopolysaccharid-Proteinkomplexe, die in der Zellwand verankert sind. Diese werden auch als somatische Antigene bezeichnet, wobei sich lediglich die Polysaccharidketten durch Anzahl, Art und Verknüpfung der Kohlenhydrate serologisch unterscheiden. Darüber hinaus gibt es die H-Antigene. Hierbei handelt es sich um hitzelabile und formaldehydbeständige Geißelantigene mit einer Proteinstruktur, bei der die unterschiedliche Aminosäuresequenz die serologische Spezifität ausmacht. Bei den H-Antigenen ist außerdem ein Phasenwechsel zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Phase bekannt, die ebenfalls unterschiedlich zueinander serologisch reagieren (BISPING u. AMTSBERG 1988). Zusätzlich kommt bei den *Enterobacteriaceae* ein K-Antigen (Kapselantigen) vor. Dies

besteht aus verschiedenen Kohlenhydraten, die durch deren räumliche Anordnung eine serologische Determinante bilden. Bei den Salmonellen bilden jedoch nur *S. Typhi* und *S. Paratyphi* das K-Antigen aus, welches bei diesen Serovaren als vi-Antigen bezeichnet wird und die O-Agglutination stören kann (SELBITZ 2006).

Im Zuge des medizinischen Fortschritts im letzten Jahrhundert und aufgrund der weltweiten Verbreitung und enormen Bedeutung von Salmonellen wurde es erforderlich, das Genus *Salmonella* genauer zu klassifizieren.

1926 gelang es dem britischen Bakteriologen White durch Antigenanalysen Salmonellen serologisch zu unterscheiden. Diese grundlegenden Arbeiten führte Kaufmann dann ab 1933 fort und erstellte Antigentabellen, die die Basis für das Kauffmann-White-Schema bilden. Dies ist bis in die heutige Zeit noch gültig, da es von dem französischen Bakteriologen POPOFF in regelmäßigen Abständen aktualisiert wird.

In diesem Schema können den unterschiedlichen Antigenformeln der O-, H- und K-Antigene, welche mit Hilfe von bestimmten Antiseren nachweisbar sind, entsprechende Serovare zugeordnet werden.

Eine darüber noch hinausgehende Differenzierungsmöglichkeit stellt die Lysotypie dar, bei der es durch unterschiedliche Empfänglichkeit zur Lyse des Bakteriums durch so genannte Typisierbakteriophagen kommt. Durch die Unterscheidung der Lysisbilder lassen sich die Stämme bestimmter Serovare bestimmten Lysotypen zuordnen (HAHN et al. 1994).

Ursprünglich wurden fast alle neuen, im Kauffmann-White-Schema aufgeführten Serovare mit Eigennamen belegt. Aus Gründen der Übersicht wird dieses Prinzip jedoch nur noch bei den Eigennamen der zur Subspezies *enterica* zählenden Serovare angewendet: z. B. *S. enterica* ssp. *enterica* ser. *Infantis*. Wegen der praktischeren Schreibweise wird heute nach dem Gattungsnamen *Salmonella* nur noch der Serovarnamen geschrieben, beginnend mit großem Buchstaben, um den Serovarcharakter deutlich zu machen: z. B. *S. Infantis*. Die Vertreter der anderen Subspezies werden durch die Angaben der Antigenformel benannt (SELBITZ 2006).

## 2.2 Physiologie des Genus *Salmonella*

### 2.2.1 Morphologie und Biochemie von *Salmonella*

Aufgrund ihrer charakteristischen biochemischen Stoffwechselleistungen und des daraus resultierenden Wachstums in unterschiedlichen Medien lässt sich das Genus *Salmonella* von anderen Vertretern der *Enterobacteriaceae* gut abgrenzen.

Bei den Salmonellen handelt es sich um 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm große, gramnegative, sporenlose, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, die, bis auf wenige Ausnahmen (z.B. *S. Gallinarum*), beweglich sind (SELBITZ 2006). Ihre Geißeln sitzen entweder an den Längsseiten oder inserieren allseits.

Salmonellen sind relativ anspruchslos und wachsen auf einfachen Agar-Nährböden als helle, runde, glänzende Kolonien. Dem Nährboden muss jedoch ein Hemmstoff zugesetzt werden, um grampositive und andere, nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehörenden, gramnegativen Stäbchen zu unterdrücken.

Charakteristische Stoffwechselleistungen der Salmonellen sind die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, die Glukosefermentation unter Gasbildung sowie die Bildung von H<sub>2</sub>S. Sie decarboxylieren Ornithin, Lysin und Arginin und können außerdem Sorbit, Maltose, Arabinose, Xylose und Rhamnose verwerten. Salmonellen besitzen die Fähigkeit, Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Oxidase-Reaktion ist wie bei allen *Enterobacteriaceae* negativ, ebenso wie die Urease-, Indol- und Azetonbildung. Lactose, Saccharose, Salicin und Adonit werden nicht verwertet (DE RYCK et al. 1994; LE MINOR 1984; SELBITZ 2006).

### 2.2.2 Virulenzfaktoren von *Salmonella*

Bei Salmonellen sind heute mehr als 200 Virulenzfaktoren beschrieben, welche die Fähigkeit des Erregers bezüglich Adhäsivität, Invasivität, fakultativ intrazellulärem Parasitismus und Toxinbildung (Endo-, Zyto-, und Enterotoxine) bewerkstelligen (SCHWARTZ 1999; BÄUMLER et al. 2000). Dazu gehören Fimbrien, das LPS und andere, meist auf den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln kodierte Virulenzfaktoren, die ein intrazelluläres Überleben und die Replikation sichern.

Die Adhäsion der Salmonellen an die Enterozyten wird hauptsächlich über Fimbrien bewerkstelligt. Diese besitzen eine filiforme Eiweißstruktur mit einem Durchmesser von 2-7 nm. Die Bindung erfolgt von Seiten des Erregers über Lektinstrukturen an den Fimbrien, die an Mannose oder andere Kohlenhydrat enthaltende Rezeptoren sowie an Fibronektine der Zielzellen binden. ALTHOUSE et al. (2003) fanden heraus, dass die Adhäsion an Enterozyten über Mannosesensible Fimbrien des Typ I geschieht, während im Mausmodell die Adhäsion an die M-Zellen über sogenannte *Long polar fimbriae* (Lpf) ermöglicht wird (BÄUMLER et al. 1996).

Die Invasion von Salmonellen in die Enterozyten oder M-Zellen des Darms geschieht über Virulenzfaktoren, die durch *Salmonella*-Pathogenitäts-Inseln (SPI) kodiert sind. Dies sind Regionen auf der chromosomalen DNA pathogener *Salmonella* ssp., die ausschließlich Virulenzfaktoren zur Ausbildung bringen (BOWE et al. 1998). Inzwischen sind fünf *Salmonella*-Pathogenitäts-Inseln bekannt, wobei die Pathogenitätsinseln SPI 1 und SPI 5 die Gene für die Invasion der Erreger in die Enterozyten kodieren. Hingegen sind die SPI 2, SPI 3 und SPI 4 für das intrazelluläre Überleben und die Replikation verantwortlich, wodurch ein systemisches Eindringen in den Organismus ermöglicht wird (FIELDS et al. 1986; MORGAN et al. 2004). Durch intrazytoplasmatische Injektion von bestimmten Effektorproteinen in Enterozyten bzw. M-Zellen über ein Typ III-Sekretionssystem (TTSS) kommt es zu einer Modulation der zelleigenen Signaltransduktionswege und es entstehen bestimmte Strukturen an deren Zytoskelett, die so genannten *Ruffles*. Diese umschließen die Erreger als „Makrospinosomen“ und transportieren sie in das Zytoplasma (FINLAY et al. 1991; JONES et al. 1991; GARCIA DEL PORTILLO u. FINLAY 1994; ZHOU u. GALAN 2001). So wird die Bedeutung des TTSS in der Manipulation der Wirtszelle deutlich (GALAN u. COLLMER 1999; GALAN u. ZHOU 2000).

Darüber hinaus sind seit über 20 Jahren bei *S. Typhimurium* Virulenzplasmide bekannt, welche allerdings bei *S. Infantis* und *S. Derby* nicht vorkommen. Wie im Mausmodell nachgewiesen wurde, erhöhen diese Virulenzplasmide die Fähigkeit, extraintestinale Organe befallener Organismen zu besiedeln (LIBBY et al. 2000). Die Gene des Virulenzplasmids kodieren außerdem für spezifische Eiweiße, die eine Serumresistenz bewirken.

Das LPS als Hauptvirulenzträger ist ein Bestandteil der äußeren Membran. Es bestimmt einerseits die Wirtsspezifität, andererseits wird der Schutz vor Phagozytose gewährleistet und einer Zerstörung durch die Komplementkaskade bzw. durch Makrophagen entgegengewirkt (SAXEN et al. 1987; ROBBINS et al. 1992). Das LPS sichert außerdem das Überleben im Gastrointestinaltrakt (NNALUE u. LINDBERG 1990).

Bei einigen *Salmonella*-Serovaren ist ein Enterotoxin beschrieben worden, das jedoch bisher nicht ausreichend charakterisiert werden konnte. *S. Typhimurium* produziert ein Cholera-like-Toxin, das nahe verwandt ist mit dem hitzelabilen Toxin von *Escherichia coli* und dem Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* (PRASAD et al. 1992). Dieses Toxin bewirkt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels sowie eine Ausschüttung von Prostaglandin E<sub>2</sub> der Enterozyten.

Außer den bereits aufgeführten Virulenzfaktoren kommen bei Salmonellen noch Geißeln, Hitzeschockproteine, Zytotoxine und Siderophore vor.

### **2.3 Epidemiologie des Genus *Salmonella***

Salmonellen sind weltweit verbreitet und konnten sowohl aus Säugern als auch aus Vögeln und Reptilien isoliert werden. Dabei sind einige Vertreter streng an eine Tierart angepasst, andere haben ein breit gefächertes Wirtsspektrum. Man kann dabei unterscheiden:

#### Beim Tier vorkommende, wirtsspezifische Serovare:

Sie verursachen ausgeprägte und charakteristische Krankheitsbilder von perakutem bis chronischem Verlauf. Es kommt hier meist zu fiebrigen Durchfällen und/oder Aborten. Beispiele sind *S. Dublin* beim Rind, *S. Choleraesuis* beim Schwein, *S. Abortusovis* beim Schaf und *S. Gallinarum-Pullorum* beim Geflügel.

#### Nicht wirtsspezifische, stark virulente Serovare:

Diese gelten als Haupterreger von Zoonosen und haben enorme Bedeutung für den Menschen im Zusammenhang mit der *Enteritis infectiosa*. Bei den Tieren sind sowohl schwere seuchenhafte Verläufe als auch latente Infektionen möglich. Hierzu zählen *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*.

#### Nicht wirtsspezifische, schwach virulente Serovare:

Dazu gehören die meisten Vertreter der Spezies *Salmonella*. Hier sind milde Enteritiden und latente Infektionen die Regel, wobei einige auch als Zoonoseerreger Bedeutung haben wie z.B. *S. Infantis*.

### Human-adaptierte Serovare:

Hier besitzen nur die Subspezies *S. Typhi* und *S. Paratyphi* eine Bedeutung als Erreger des Typhus und Paratyphus.

Das Habitat der Salmonellen ist der Gastrointestinaltrakt der Tiere. Die Übertragung erfolgt meist über Ausscheidungen infizierter Tiere oder aber über kontaminierte Gegenstände (Stallanlagen, Geräte, Transportfahrzeuge), Trinkwasser und Futtermittel. Ebenso spielen Schädlinge, Wildvögel und Insekten als Keimträger eine wichtige Rolle.

Einen bedeutenden Infektionskreis für Salmonellen stellt der landwirtschaftliche Nutztierbestand dar. Die Einschleppung in den Bestand erfolgt meist über Zukauf von Jungsaugen oder Mastläufern, die latent infiziert sind. Da der fäkal-orale Übertragungsweg im Vordergrund steht, spielt das Überleben der fäkal ausgeschiedenen Salmonellen im Stall eine beträchtliche Rolle. Abhängig von Faktoren wie Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, Nährstoffgehalt etc. ist eine Tenazität von ein bis zwei Jahren möglich (DEDIÉ 1993). So genügt *S. Typhimurium* ein Nährstoffangebot von 60 mg/l. Außerdem werden Temperaturen von 7 bis 47°C toleriert (BÖHM 1993). Ermöglicht wird dies durch spezielle Resistenzmechanismen. Sind dann wieder optimale Bedingungen für das Wachstum gegeben, so führt dies zu einer exzessiven Vermehrung des Erregers (PIETZSCH 1981).

### **2.3.1 Epidemiologie der Salmonellose des Menschen**

Die Salmonellose wird als wichtigste vom Schwein übertragene Zoonose betrachtet (NIELSEN 2002).

Klinisch und ätiologisch lassen sich Salmonelleninfektionen des Menschen in zwei Gruppen einteilen:

1. Typhöse Salmonellosen, die durch die humanadaptierten Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C sowie *S. Sendai* hervorgerufen werden und nach dem Schema einer Allgemeininfektion verlaufen,

2. Gastroenterische Salmonellosen, die durch nicht speziesadaptierte Serovare wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* ausgelöst werden und beim Menschen Symptome eines Brechdurchfalls verursachen (SANDER 1993; SELBITZ 2006)

Da die Serovare *S. Typhi*, *S. Paratyphi* und *S. Sendai* nicht den Zoonoseerregern zugerechnet werden, sondern fast ausschließlich im Infektionsgeschehen des Menschen eine Rolle spielen, bleiben sie bei den folgenden Ausführungen unberücksichtigt.

Neben *Campylobacter*-Spezies sind vorwiegend Serovare der Subspezies 1 von *Salmonella enterica* die wichtigsten bakteriellen Durchfallerreger beim Menschen in den Industrieländern (RASCH u. SCHRADER 1996).

Die Epidemiologie der humanen Salmonelleninfektionen ist durch starke Schwankungen geprägt. Diese Schwankungen begründen sich in der Abhängigkeit von der *Salmonella*-Prävalenz in den Tierbeständen, den Überlebens- und Vermehrungsbedingungen in der Lebensmittelindustrie, der Virulenz des Erregers und dem jeweiligen Immunstatus der Bevölkerung.

Aufgrund ihrer Meldepflicht nach § 7 des Infektionsschutzgesetzes konnten im Jahr 2007 insgesamt 55.400 Fälle der salmonellenbedingten *Enteritis infectiosa* registriert werden (ANONYMUS 2008a). Infolge nicht diagnostizierter oder nicht gemeldeter Erkrankungen geht man jedoch von einer 10fach höheren Dunkelziffer aus (METHNER et al. 2001; KOCH et al. 2002).

Im Jahr 2005 waren die am häufigsten isolierten Serovare von *Salmonella enterica* *S. Enteritidis* (68 %), gefolgt von *S. Typhimurium* (25 %), sowie in weitem Abstand von *S. Bovismorbificans* und *S. Infantis* (um 1 %), *S. Virchow* (0,4 %) und *S. Derby* (0,3%) (ANONYMUS 2006).

Die Zahl der dokumentierten Salmonellenerkrankungen ist zwar seit 1992 rückläufig, stagniert aber in den letzten Jahren auf relativ hohem Niveau (METHNER et al. 2001).

Die größte Inzidenz der humanen Salmonellose liegt zwischen den Monaten Juli bis Oktober. Dabei ist ein unterschiedliches epidemiologisches Verhalten der einzelnen *Salmonella*-Spezies zu verzeichnen. Der sporadisch auftretende Typ, wie er für *S. Infantis* typisch ist, ist mit 85 % der am häufigsten vorkommende in Deutschland. Salmonellen treten aber auch epidemisch stetig auf, wie es z.B. bei *S. Typhimurium* oft der Fall ist. Allerdings sind die Ursachen für diese verschiedenen Epidemietypen noch nicht geklärt.

Eine Infektion erfolgt vorwiegend oral über Lebensmittel, die primär oder sekundär kontaminiert sind (SANDER 1993). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch spielt dagegen nur in 10 % der Fälle eine Rolle (RASCH u. SCHRADER 1996). Ein direkter Kontakt mit infizierten Tieren, z.B. auf Schlachthöfen oder über Heimtiere, führt ebenfalls nur in seltenen Fällen zu einer Erkrankung (KRAUSS et al. 1997). Die minimale Infektionsdosis liegt bei  $> 10^5$  Keimen für *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Die Klinik des Salmonellen-bedingten Durchfallgeschehens ist geprägt von Brechdurchfall, kolikartigen Bauchschmerzen, und häufig begleitendem Fieber, wobei die Symptome oft bereits nach wenigen Stunden auftreten. Bei der *Enteritis infectiosa* handelt es sich um eine lokal beschränkte und selbstlimitierende Erkrankung, die jedoch bei immunsupprimierten Menschen, wie Senioren und Kleinkinder, durch Organbesiedlung, Septikämie und Arthritis, auch zu einem typhoiden Verlauf führen kann (HOF et al. 2000). Bei dem oben genannten Personenkreis führt aufgrund der schlechten Abwehrlage potentiell bereits eine Dosis von weniger als 100 Keimen zu einer Erkrankung. Die humane Salmonellose stellt generell ein Hygieneproblem dar, da sie hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel übertragen wird. Dabei reicht eine primäre Kontamination für die Auslösung einer Erkrankung meist nicht aus, sodass zunächst eine Vermehrung in dem entsprechenden Lebensmittel erfolgen muss (SELBITZ et al. 1995; MEYER 1999; FEHLHABER 2001). Begünstigt wird dies durch ungenügende Erhitzung von rohem Fleisch, unangemessen lange Warmhalteperioden bei Temperaturen von 10 bis 65°C sowie durch fehlende oder unzureichende Kühlung (BRYAN 1988). Infolgedessen gilt die Verbraucheraufklärung hinsichtlich einer ausreichenden Küchenhygiene als eine der wichtigsten Präventivmaßnahmen.

### **2.3.2 Epidemiologie der Salmonelleninfektion des Schweins**

Bei der Salmonellose des Schweins muss zwischen Infektionen mit den speziesadaptierten Serovaren *S. Choleraesuis* und *S. Typhisuis* (primäre Salmonellose) und den nicht speziesadaptierten Serovaren (sekundäre Salmonellose) unterschieden werden.

Infektionen mit *S. Choleraesuis* verursachen aufgrund ihrer meist septikämischen Verlaufsformen schwere wirtschaftliche Verluste. In den USA und Kanada zählen sie zu den wirtschaftlich bedeutendsten bakteriellen Infektionen des Schweins (REED et al. 1986;

KRAMER 1995). In der ehemaligen DDR spielten sie bis zur Einführung von Impfmaßnahmen ebenfalls eine große Rolle (SCHÖLL 1982). Dagegen sind Infektionen mit *S. Typhisuis* eher selten. Die Erkrankung beschränkt sich in der Regel auf einzelne Bestände, bei denen sie mitunter aber hohe wirtschaftliche Verluste bei Ferkeln verursachen kann (SELBITZ 2006; SELBITZ et al. 1995). Sowohl *S. Choleraesuis* wie auch *S. Typhisuis* haben in Deutschland heute nur wenig Bedeutung (BAUER u. HÖRMANNSDORFER 1995).

Durch nicht speziesadaptierte Serovare ausgelöste klinisch manifeste Erkrankungen sind vor allem nach Infektionen mit *S. Typhimurium* zu beobachten. Obwohl enterokolitische Verlaufsformen die Regel sind, können durchaus schwere septikämische Erkrankungen vor allem bei Mastschweinen und Absatzferkeln hervorgerufen werden. Aber auch *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Heidelberg* und *S. Newport* werden, wenn auch seltener, bei klinischen Erkrankungen isoliert (BAUER u. HÖRMANNSDORFER 1995).

Meist bleiben die Infektionen mit nicht speziesadaptierten Serovaren jedoch latent. Diese Tatsache verleiht den Erregern insbesondere im Rahmen der Fleischhygiene eine entscheidende Bedeutung, da infizierte Tiere aufgrund fehlender klinischer Symptome unerkant bleiben, aber trotzdem während des Schlachtprozesses die Produkte kontaminieren (GAREIS 1995; SELBITZ 2006).

In einer Prävalenzstudie des Nationalen Referenzlabors für Salmonellen am BfR im Jahr 2006/2007 wurden 12,7 % aller untersuchten Mastschweine bakteriologisch positiv für *Salmonella* ssp. beprobt. Dabei erzielten die höchsten Nachweisraten *S. Typhimurium* mit 55,21 %, gefolgt von Salmonellen der Gruppe B mit 19,94 % und *S. Derby* mit 8,90 %. *S. Infantis* folgte an fünfter Stelle mit 2,45 % (ANONYMUS 2008b).

## 2.4 Pathogenese porziner Salmonellosen

Das klinische Erscheinungsbild der porzinen Salmonellose ist vielfältig und wird durch zahlreiche die Pathogenese beeinflussende Faktoren bestimmt. Die Hauptrolle kommt hierbei insbesondere der Serovar, ihrer Virulenz, der Infektionsdosis, dem Infektionsweg und der Resistenzsituation des Wirtes zu (DEDIE et al. 1993; SCHWARTZ 1999).

Während *S. Typhisuis* aufgrund ihrer hohen Virulenz nicht zwingend Hilfsursachen für die Auslösung einer Erkrankung benötigt, werden klinische Salmonellosen bei den nicht speziesadaptierten Serovaren, aber auch bei *S. Choleraesuis* häufig im Zusammenhang mit resistenzmindernden Faktoren betrachtet (SELBITZ et al. 1995; SCHWARTZ 1999). Ein

schlechter Gesundheitszustand, mangelnde Betriebshygiene, Überbelegungen der Buchten sowie die Umgruppierung von Tieren, Futterumstellungen und ein mangelhaftes Stallklima fördern dabei die Ausbildung klinisch manifester Erkrankungen und vermögen die Infektion über längere Zeiträume hinweg aufrechtzuerhalten (SCHWARTZ 1991).

Obwohl *Salmonella*-Infektionen bei Schweinen jeden Alters auftreten können, erkranken bevorzugt Tiere im Zeitraum vom Absetzen bis hin zum 3./4. Lebensmonat.

Gründe hierfür liegen mit hoher Wahrscheinlichkeit in der mangelnden Ausbildung einer physiologischen Darmflora und dem noch nicht ausgereiften Immunsystem (CLARKE u. GYLES 1993; WALDMANN u. PLONAIT 2004). Besonders gefährdet sind Tiere direkt nach dem Absetzen. Der durch Umstallung, Klima- und Futterwechsel hervorgerufene Stress führt zur Freisetzung von Katecholaminen. Folge ist neben einer herabgesetzten Immunantwort eine herabgesetzte Säureproduktion und somit der Anstieg des pH-Wertes im Magen, wodurch die Abtötung der Salmonellen bei ihrer Passage reduziert wird (SELBITZ et al. 1995; SCHWARTZ 1999).

Aber auch bei Saugferkeln können Infektionen nachgewiesen werden. Sie erkranken jedoch selten. Die Ursache hierfür liegt höchstwahrscheinlich in einer Übertragung maternalen Antikörper, die als Reaktion auf eine Infektion der Sau *ante partum* oder infolge einer Impfung gebildet werden.

Die Infektion mit Salmonellen erfolgt in der Regel oral. In seltenen Fällen ist aber auch ein aerogener oder konjunktivaler Übertragungsmodus möglich (BLAHA 1993; BAUER u. HÖRMANNSDORFER 1995).

Die Infektionsdosis, die für die Auslösung einer klinisch manifesten Erkrankung beim Schwein benötigt wird, ist zum einen von der Serovar und ihrer Virulenz und zum anderen von der Resistenzlage des Tieres abhängig. Experimentell ermittelte Zahlen setzen eine Aufnahme von mehr als  $10^7$  Keimen voraus. Jedoch ist unter Praxisbedingungen, aufgrund der vielfältigen resistenzmindernden Faktoren, auch oft nur eine geringere Infektionsdosis nötig (SCHWARTZ 1999).

Nach der oralen Aufnahme und der sich anschließenden Passage durch den Magen heften sich die Salmonellen an das Darmepithel an, was einen entscheidenden Pathogeneseschritt darstellt und höchstwahrscheinlich über Fimbrien vermittelt wird. Anschließend werden die Erreger einerseits von M-Zellen (Microfold-Zellen) der Peyerschen Platten phagozytiert und andererseits dringen sie in Enterozyten der Zottenspitzen vorzugsweise des terminalen Ileums sowie des Colons ein. In einer Vakuole erfolgt dann der Transport zur Lamina propria, in der sie von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden und entzündliche

Reaktionen sowie Thrombosen in den Gefäßen hervorrufen. Die Degeneration der Enterozyten, die Verkürzung der Mikrovilli, eine verstärkte Sekretion der Becherzellen sowie die Entzündungsreaktion der Lamina propria führen zu dem Bild der typhlokolitischen Salmonellose. Der hierbei auftretende Durchfall kommt sowohl durch Enterotoxine zustande, die eine aktive Sekretion von Elektrolyten und Flüssigkeit durch Aktivierung des Adenylat-Cyclase-Systems bewirken, als auch entzündungsbedingt durch Prostaglandine (WALDMANN u. PLONAIT 2004; HEINRITZI 2006). Gelingt es den Salmonellen, die Darmwand zu passieren, gelangen sie zunächst in die regionalen Lymphknoten. Von dort aus werden sie über Lymph- und Blutgefäße weitertransportiert und sammeln sich vorwiegend im Endoretikulären System von Leber und Milz an. Durch die Freisetzung von Endotoxinen werden systemische Effekte wie Fieber und Gefäßschäden mit Thrombose hervorgerufen. Bleibt eine Eindämmung der Infektion aus, treten septikämische Verlaufsformen mit Absiedlung der Salmonellen in einzelne Organe auf (CLARKE u. GYLES 1993).

Nach experimenteller oraler Infektion konnten Salmonellen bei Schweinen außerhalb des Gastrointestinaltraktes neben Leber und Milz auch aus Organproben von Lunge, Niere und Skelettmuskulatur gefunden werden (COTÉ et al. 2004; MARG et al. 2001). Der häufigste Nachweis von *S. Typhimurium* gelang aus den Tonsillen, gefolgt von Darmabschnitten von Jejunum bis zum Rektum und dabei vorwiegend aus dem Caecum. Die nächst häufig besiedelten Gewebe sind die Mandibularlymphknoten, gefolgt von dem Ln. ileocaecalis (WOOD et al. 1989; FOSTER et al. 2003).

## 2.5 Klinik porziner Salmonellosen

Auch beim Schwein muss zwischen einer primären und sekundären Salmonellose unterschieden werden.

Die primäre Salmonellose kann nochmals in die enterische, die lokal begrenzte und abszedierende sowie die septikämische Form unterteilt werden. Der Verlauf ist abhängig von der Abwehrlage des Tieres, die durch verschiedene Stressoren, den Manifestationsort, und der Infektionsserovar geprägt wird. Zu einer Infektion kommt es hauptsächlich über latent infizierte Tiere (FEDORKA-CRAY 1997). Eine Infektion mit *S. Choleraesuis* betrifft nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bis hin zu mehreren Wochen vor allem Schweine in einem Alter von zwei bis vier Monaten, die an einer perakuten bis chronischen Form erkranken. Es steht hier meist die Septikämie im Vordergrund, in deren Verlauf gehäuft Todesfälle auftreten können (ANDERSON et al. 1998). Bei der akuten Form zeigen die Tiere hohes Fieber (40,5-42°C), Mattigkeit, Fressunlust, Erbrechen, Diarrhoe sowie Zyanose. Charakteristisch ist eine blaurote Verfärbung der Ohrmuscheln, die sich bald auch an der Rüsselscheibe, dem Unterbauch und den Gliedmaßen zeigt (WALDMANN u. PLONAIT 2004). Entwickelt sich daraus eine subakute und chronische Salmonellose, so folgt der zuerst vorherrschenden Obstipation meist Durchfall mit wechselnder Kotkonsistenz. Die typische Färbung des Kotes ist gelbgrau, teilweise mit Blutbeimengungen. Die betroffenen Tiere kümmern (DEDIE et al. 1993).

Der Sektionsbefund im akuten Stadium ist durch ödematöse Schwellung der Mesenteriallymphknoten, Milzschwellung, hämorrhagische Ileitis, eventuell Gastritis und submiliare Leberherde charakterisiert.

Die wesentlich seltenere Erkrankung, verursacht durch *S. Typhisuis*, verläuft chronisch mit nekrotisierender Kolitis, verkäsender Lymphadenitis der Mediastinal- und Pharyngeallymphknoten sowie herdförmiger Pneumonie (WALDMANN u. PLONAIT 2004). Erreger der sekundären Salmonellose sind nicht an das Schwein angepasste *Salmonella*-Serovare. In Deutschland wird dabei vorwiegend *S. Typhimurium* isoliert. Je nach Infektionsdosis und Abwehrlage des Tieres können mitunter auch perakute bis akute Krankheitsverläufe auftreten, jedoch verlaufen die meisten sekundären Salmonellosen latent und münden in einem Dauerausscheidertum (GAREIS 1995). Eintragsquelle ist hierbei meist kontaminiertes Futter, aber auch belebte Vektoren wie Schadnager spielen eine Rolle (SELBITZ 2006; BLAHA 1993; STEGE et al. 1997).

Besonders schwere Verlaufsformen der sekundären Salmonellose des Schweins werden überwiegend durch *S. Typhimurium* DT104 verursacht. So kann man bei einem perakuten oder akut-septikämischen Verlauf hier als pathologisch-anatomisches Bild eine akute katarrhalische bis hämorrhagisch-fibrinöse Gastroenteritis, generalisierte petechiale Blutungen in den serösen Häuten, Milzhyperplasie und ödematöse Lymphknotenschwellungen feststellen. Bei dem subakuten bis chronischen Verlauf entwickeln sich sowohl eine diphteroid-nekrotisierende Typhlokolitis, als auch Hyperplasien von Milz und Lymphknoten. Miliare Nekrosen in Mesenteriallymphknoten, Milz, Leber, Knochenmark, Lunge und Nieren sind auffindbar. Manche Tiere können von eitrigem Bronchopneumonien, serofibrinösen Polyserositiden, Polyarthritiden, Tendovaginitiden, Peri- und Myokarditiden sowie Nabelentzündungen betroffen sein. Typisch für eine *S. Typhimurium*-Infektion ist eine mit einer Thrombophlebitis vergesellschaftete, ulzerierende Proktitis, die aufgrund von Thrombosen zu einer ischämischen Proktitis wird. Weitere Folgen sind daher oft narbige Rektumstrikturen, gefolgt von Obstipationen, Tympanie und Abmagerung (WALDMANN u. PLONAIT 2004).

Salmonellosen, die durch *S. Infantis* oder *S. Derby* hervorgerufen wurden, kommen vergleichsweise selten vor und wurden bisher nur in Tierversuchen dokumentiert. In einem Infektionsversuch bei Schweinen mit *S. Infantis* beschrieben NIELSEN et al. (1995) Durchfall der Tiere bis zum 3. Tag *post infectionem*, ein gering- bis mittelgradig reduziertes Allgemeinbefinden und verminderten Appetit.

## **2.6 Diagnostik von *Salmonella* ssp.**

### **2.6.1 Kultureller Nachweis**

Für den kulturellen Nachweis von Salmonellen sind bis heute eine Vielzahl von Methoden beschrieben worden. Umfassende Untersuchungen zeigten jedoch große Unterschiede zwischen der *Salmonella*-Nachweisrate und der jeweils gewählten Methode (EDEL u. KAMPELMACHER 1968; EDEL u. KAMPELMACHER 1973; EDEL u. KAMPELMACHER 1974; WALTMAN u. MALLINSON 1995).

Unabhängig von der Natur der Probe besteht heute wie schon seit Jahrzehnten dieselbe Vorgehensweise für die Isolierung von Salmonellen aus nicht-selektiver Voranreicherung, selektiver Voranreicherung, nachfolgendem Ausstrich auf selektiven festen Agarmedien sowie endgültiger biochemischer und serologischer Bestimmung der Isolate.

Ein Direktausstrich von Proben ist nur in der akuten Phase einer Infektion sinnvoll, da nur dann die Keimzahl der ausgeschiedenen Salmonellen im Vergleich zur absoluten Keimzahl erhöht ist (WALTMAN 2000).

Die amtliche Untersuchung zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln laut § 64 LFGB lehnt sich eng an die Norm 6579:2002 der International Organisation for Standardisation (ISO) an.

Der kulturelle Nachweis gliedert sich dabei in drei unterschiedliche Arbeitsschritte. Als erstes erfolgt die nichtselektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser für 16-20 Stunden bei 37°C. Diese nährstoffreiche Bouillon bewirkt eine Wiederbelebung subletal geschädigter Bakterien und ein intensives Wachstum, was zu einer erhöhten Keimausbeute führt. Der Phosphatpuffer hält außerdem den pH-Wert konstant.

Der zweite Schritt besteht in einer selektiven Anreicherung in Rappaport-Vasiliadis-Medium (RV-Medium) und parallel in Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon nach Müller-Kauffmann. Seit einiger Zeit wird die Selektivanreicherung mit durch Agarzusatz modifizierten, halbfesten Rappaport-Vassiliadis-Medium (MSRV) durchgeführt. Dieser von DE ZUTTER et al. (1991) entwickelte Nährboden erzielte im Vergleich zum herkömmlichen RV-Medium einen schnelleren Nachweis positiver Salmonellen-Befunde. Der Nachweis gelingt durch die Beweglichkeit der Salmonellen, die in den halbfesten Nährboden eindringen und um die Inokulationsstelle eine Schwärmzone bilden. Die Beweglichkeit anderer Keime wird durch die selektiven Wirkstoffe (Magnesiumchlorid, Malachitgrün und Novobiocin) und die erhöhte Inkubationstemperatur von 42°C weitgehend gehemmt.

Zuletzt werden für die Abgrenzung von anderen Bakterienarten feste Selektivnährböden verwendet, bei denen man sich die Stoffwechselleistungen der Salmonellen zunutze macht. Grundsätzlich sollten immer zwei verschiedene Nährböden verwendet werden. Die ISO 6579:2002 fordert einen Ausstrich auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) und einen weiteren festen Selektivnährboden. Der XLD-Agar dient zur Isolierung und Differenzierung pathogener *Enterobacteriaceae* besonders für Shigellen und Salmonellen. Als weiterer Selektivnährboden wird häufig auf den Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) zurückgegriffen. Die Bebrütung erfolgt bei 37°C für 24 h. Die Bestimmung der Serovare erfolgt über kommerziell erhältliche O- und H- Antiseren mittels

der Objektträgerschnellagglutination (BISPING u. AMTSBERG 1988; SELBITZ et al. 1995; SELBITZ 2006).

### **2.6.2 Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Eine weitere Methode zum direkten Nachweis von Salmonellen ist die PCR. WIDJOJOATMODJO und Mitarbeiter (1992) entwickelten als erste eine solche Methode. Hierzu werden Oligonukleotide genutzt, die auf einem Abschnitt des Replikationsgens *oriC* basieren. RAHN und Mitarbeiter wählten für ihre Salmonellen-spezifische PCR Oligonukleotide, die auf dem von GALAN und Mitarbeitern entdeckten *invA*-Gen basieren (GALAN et al. 1992; RAHN et al. 1992). Die Spezifität dieser Methode lag bei 100 %. Durch Sequenz-Analyse von verschiedenen *Salmonella*-Serovaren konnten OLSEN et al. (1991) einen DNA-Bereich ermitteln, der eine komplette Basenhomologie in allen Serovaren aufwies. AABO und Mitarbeiter entwickelten (1993) darauf aufbauend ein Oligonukleotidpaar, das ebenfalls eine 100 % spezifische PCR ergab. Die oben beschriebenen Oligonukleotide nach Rahn et al. (1992) und Aabo et al. (1995) werden vom Deutschen Institut für Normung, e.V., in der DIN 10135 (ANONYMUS 1999) als geeignete Oligonukleotidpaare für den Nachweis von Salmonellen angegeben. Jedoch können nach fachlicher Prüfung auch andere Oligonukleotide verwendet werden. Eine solche geeignete Salmonellen-PCR ist zum Beispiel die ebenfalls auf dem *invA*-Gen basierende PCR von ARNOLD und Mitarbeitern (2004), die insbesondere bei der Untersuchung von Organmaterial Vorteile hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität gegenüber der etablierten PCR von RAHN et al. (1992) bietet.

### **2.6.2 Serologischer Nachweis**

Die bakteriologische Untersuchung von Kotproben auf Salmonellen gilt insofern als unsicher, als besonders chronisch und latent infizierte Tiere Salmonellen nicht kontinuierlich sondern intermittierend ausscheiden und so falsch negative Ergebnisse möglich sind (BAGER u. PETERSEN 1991; BAGGESEN u. WEGENER 1993; QUINN et al. 2002).

Der serologische Nachweis von *Salmonella*-Antikörpern bietet jedoch eine gute Möglichkeit, eine bestehende bzw. überstandene Salmonelleninfektion anzuzeigen, und ist heute das wichtigste Mittel zur Einschätzung der Salmonellenprävalenzen in der Herdendiagnostik

(NIELSEN et al. 1995; WONG et al. 2002; FUNK et al. 2004; FUNK et al. 2005). Das Testsystem der Wahl ist der enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA).

Die Untersuchung von Serum- oder Fleischsaftproben mittels ELISA ist in vielen Ländern der EU im Bereich der Qualitätssicherung nicht mehr wegzudenken und bildet das Rückgrat der 2007 in Deutschland erlassenen „Schweine-Salmonellenverordnung“.

Derzeit sind in Deutschland vier unterschiedliche ELISA-Testkits zur Salmonellendiagnostik beim Schwein zugelassen. Drei davon enthalten ein Mischantigen aus Lipopolysaccharid (LPS) unterschiedlicher *Salmonella*-Serovare und sind geeignet, alle beim Schwein vorkommenden *Salmonella*-Spezies nachzuweisen (STEINBACH et al. 2000).

Ein Testkit enthält ein Vollzelllysat von *S. Typhimurium* als Antigen und lässt außerdem die Unterscheidung der einzelnen Immunglobulin-Isotypen IgA, IgG und IgM zu. Dieser Test ist somit zur Einzeltierdiagnostik geeignet (LEHMANN et al. 2003; LEHMANN et al. 2004; RÖSLER et al. 2005).

Alle vier ELISA-Systeme sind indirekt und nicht-kompetitiv. Dabei wird das aufgereinigte Antigen an eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol oder Polyvinylchlorid als feste Phase absorbiert. Durch Zugabe Antikörper-enthaltenden Serums kommt es während einer 30 minütigen Inkubationszeit zu einer kovalenten Antigen-Antikörper-Reaktion. Nicht gebundene Antikörper werden durch einen nachfolgenden Waschvorgang entfernt. Nun erfolgt die Zugabe von enzymgekoppelten, gegen die Antikörper des Serums gerichteten Immunglobulinen (Konjugat). Durch Einsatz von Konjugat, das selektiv an die unterschiedlichen gebundenen Antikörper-Isotypen bindet, wird die Isotypspezifität erreicht.

Nach einer weiteren Inkubationszeit folgt ein weiterer Waschschrift, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Anschließend zugefügtes Substrat, wie ABTS oder TMB, wird von dem konjugatgekoppelten Enzym umgesetzt, was als Farbreaktion sichtbar wird. Die Farbintensität der Reaktion wird photometrisch gemessen und ist direkt proportional zur Aktivität der Antikörper im Serum. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Vergleichsstandards bekannter Aktivitäten.

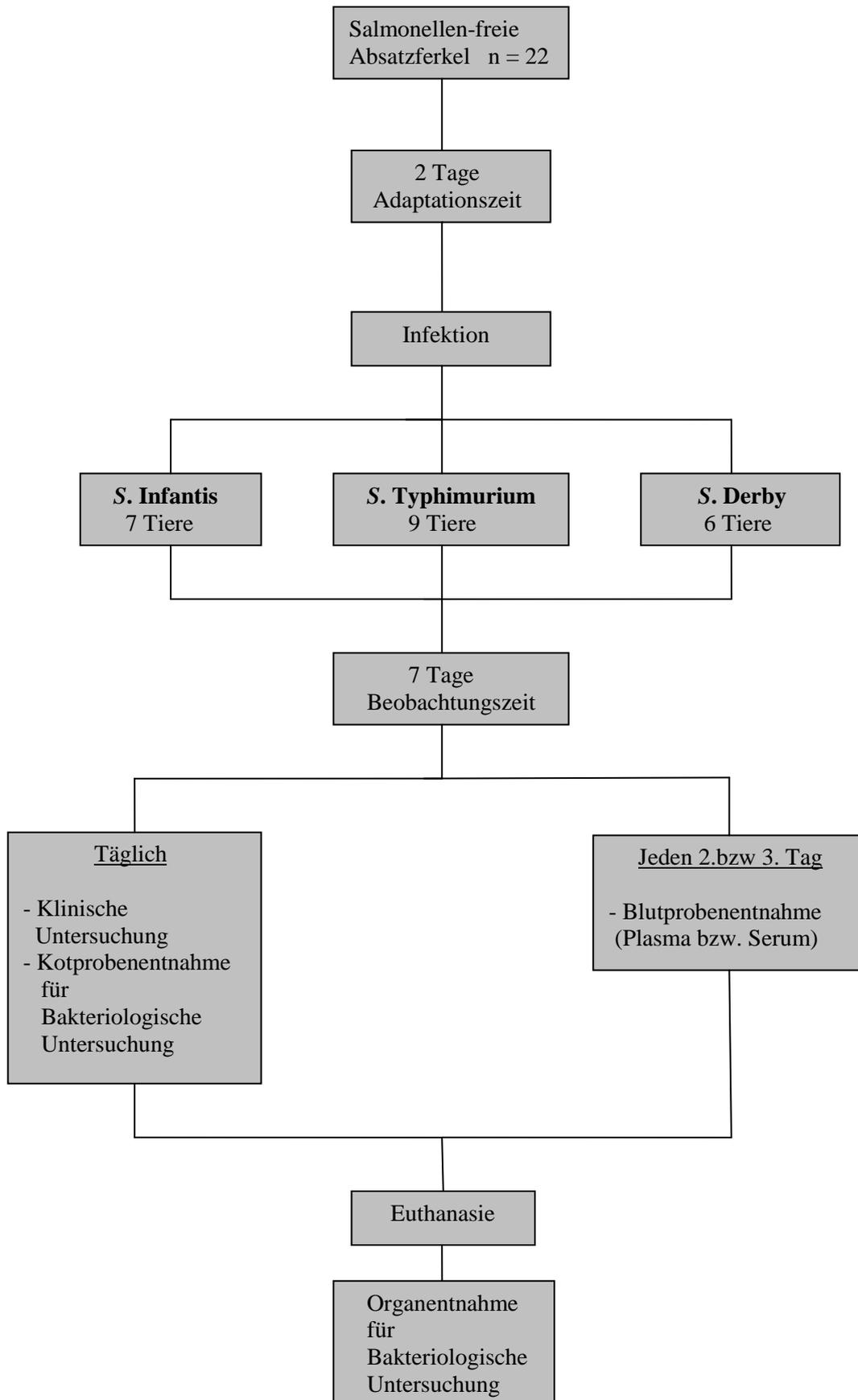
### 3 Tiere, Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein Vergleich der Infektionskinetik von den verschiedenen *Salmonella*-Stämmen *S. Infantis*, *S. Typhimurium* und *S. Derby* sowie der daraus resultierenden Immunantwort. Durch vergleichende Untersuchungen sollten Rückschlüsse auf die Pathogenese der verschiedenen Stämme und ihre Wirkung auf das Wirtstier Schwein gezogen werden. Bisherige Untersuchungen hierzu wurden hauptsächlich zu *Salmonella Typhimurium* durchgeführt, weil diese Serovar in der Vergangenheit beim Schwein am häufigsten isoliert werden konnte und *S. Typhimurium* zudem die größte Relevanz in der Lebensmittelproduktion besitzt. Jedoch gewinnt seit über 5 Jahren auch *S. Infantis* und *S. Derby* als Lebensmittelvergifter immer mehr an Bedeutung, was bei dieser Arbeit berücksichtigt werden soll.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche wurde ein bereits für *Salmonella Typhimurium* etabliertes Infektionsmodell beim Schwein verwendet (MARG et al. 2001).

Die Untersuchungen der Infektionsgruppen gliederten sich in 6 unterschiedliche Teile: zum einen die Erfassung der klinischen Parameter, die Untersuchung der qualitativen und quantitativen Salmonellenausscheidung mit den Faeces, der Serokonversion der Immunglobulin-Isotypen IgA, IgG und IgM, der Auswirkungen auf das Differentialblutbild sowie der wichtigsten blutchemischen Veränderungen im Plasma. Außerdem wurde die Invasivität und das Kolonisationsverhalten der einzelnen *Salmonella*-Isolate in einem bestimmten Organprofil untersucht (**Abbildung 2**).



**Abbildung 2.** Allgemeiner Aufbau der Infektionsversuche am Schwein mit verschiedenen *Salmonella*-Serovaren.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Verwendete Bakterienstämme

Die für die Infektionsversuche verwendeten Bakterienstämme sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 1.** Übersicht über die verwendeten Infektionsstämme

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Spezies/Charakteristika</b>
<b>S. Infantis</b>	Stammsammlung des NRL-Salm am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin	Labor Nr. 571/05 - Isolat vom Schwein - Perikarditis
<b>S. Typhimurium</b> (Wildtyp)	Institut für Mikrobiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Prof. Wolf-Dietrich Hardt	S. Typhimurium DT104 - Isolat vom Schwein - Enteritis
<b>S. Derby</b>	Stammsammlung des NRL-Salm am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin	Labor Nr. 531/05 - Isolat vom Schwein - Enteritis

### 3.2.2 Probenmaterial aus experimentell infizierten Schweinen

Für die vergleichende Untersuchung von Invasivität und Infektionskinetik wurden die in **Tabelle 2** aufgeführten Organ- und Gewebeproben nach Tötung der Tiere steril entnommen.

**Tabelle 2.** Untersuchte Organ- und Gewebeproben

<b>Gewebeprobe</b>	<b>Abkürzung</b>
Tonsille	To
Mandibular-Lymphknoten	MaLy
Leber	Le
Gallenflüssigkeit	Gf
Milz	Mi
Jejunum	Je
Jejunal-Lymphknoten	JeLy
Ileum	IL
Ileocaecal-Lymphknoten	IcLy
Caecum	Ca
Colon	Co
Colon-Lymphknoten	CoLy
Unterarm-Muskulatur	Mus

### 3.2.3 Entnahme der Blutproben

Die Blutproben wurden durch Punktion der *Vena cava cranialis* mittels Vacuetten® (Fa. Greiner) durchgeführt. Das geronnene Blut wurde bei 5000 U/ min 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Blutserum in 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Deckel überführt und für die serologische Diagnostik bei -21°C eingefroren. Das Natrium-Heparinplasma wurde analog zum Serum gewonnen und bei -80°C eingefroren. Das Kalium-EDTA-Plasma wurde zur Erstellung des Differentialblutbildes mittels des ADVIA™ 120 HEMATOLOGY SYSTEM (Fa. Bayer Vital GmbH, Fernwald) sofort ins Labor der Medizinischen Tierklinik an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig verbracht.

### 3.2.4 Voranreicherungsmedien und Nährböden für die kulturelle Diagnostik

Der kulturelle Nachweis der applizierten *Salmonella*-Stämme nach der ISO 6579:2002 erfolgte über eine nicht selektive Voranreicherung mit gepuffertem Pepton-Wasser (Fa.

Merck, Darmstadt). Bei der anschließenden Selektivanreicherung wurden MSR-V-Platten (Fa. Merck, Darmstadt) verwandt. Bei den in dieser Arbeit parallel eingesetzten Selektivnährböden handelte es sich um Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agarmedium (Fa. Merck, Darmstadt) und Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Sucrose (BPLS)-Agarmedium (Fa. Merck, Darmstadt).

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Infektionsversuche

Die Infektionsversuche fanden im voll klimatisierten Versuchstierstall der Sicherheitsstufe L2/S2 des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt (Tierversuchsvorhaben 7/05, Regierungspräsidium Leipzig). Die Schweine wurden in Gruppen von 6 bis 9 Tieren gehalten. Die Schweine erhielten Vormastfutter und Wasser ad libitum. 24 Stunden vor der Infektion wurde den Tieren das Futter entzogen.

Bei den in den Infektionsversuchen für *S. Infantis* und *S. Derby* eingesetzten Tieren handelte es sich um fünf bis sechs Wochen alte Hybridschweine (Landrasse x Edelschwein). Der Betrieb, dem die Tiere entstammten, wies in der Vergangenheit stets negative serologische und bakteriologische Salmonellenbefunde auf und war auch frei von entsprechenden klinischen Symptomen. Es handelte sich dabei um eine Leistungsprüfanstalt für Schweine in Sachsen. Die Tiere der Infektionsgruppe für *S. Typhimurium* entstammten aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Universität Leipzig und wiesen gleichermaßen weder serologische noch bakteriologische und klinische Anzeichen einer Salmonelleninfektion auf. Die für die experimentellen Infektionen eingesetzten Ferkel sowie deren Mütter wurden einzeln mittels des Salmotype® LPS-ELISA (Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig) serologisch-negativ auf Salmonellen-Antikörper untersucht. Die parallel durchgeführten kulturellen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die ISO 6579:2002 jeweils ebenfalls mit negativem Befund.

Die Infektion der Läufer erfolgte nach jeweils zwei Tagen Adaptionszeit mit einer Magenschlundsonde (Fa. Rüscher, Kernen). Vor der Infektion wurde jedes Tier mit 0,4 mg/kg Azaperon (Stresnil®) sediert. Jedes Inokulum wurde mit dem entsprechenden

Infektionsstamm auf eine Gesamtkeimzahl von  $1 \times 10^{10}$  KbE eingestellt und in einem Gesamtvolumen von 50 ml in PBS suspendiert verabreicht.

Bei jeder Infektionsgruppe wurde nach dem gleichen Untersuchungs- und Probenentnahmeschema verfahren. Es erfolgte täglich eine klinische Untersuchung unter Erfassung der Parameter Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme, Erbrechen, Durchfall und Temperatur. Zu diesem Zweck wurde ein klinischer Score angewandt, bei dem keine Auffälligkeiten mit 0, geringgradige Abweichungen vom Normalbefund mit 1, mittelgradige Abweichungen mit 2 und hochgradige Abweichungen mit 3 bewertet wurden. Die Entnahme der Kotproben zur Bestimmung der qualitativen und quantitativen Ausscheidungsrate erfolgte täglich, die Blutentnahmen aus der *Vena cava cranialis* wurden im Abstand von zwei bzw. drei Tagen vorgenommen. Nach 7 Tagen Beobachtungszeit wurden die Tiere durch Bolzenschuss betäubt und durch Entblutung getötet. Anschließend wurde ein definiertes Organspektrum, welches in **Tabelle 2** aufgelistet ist, entnommen.

### 3.3.2 Bakteriologische Untersuchung

#### 3.3.2.1 Kotproben

Zum quantitativen Nachweis der Salmonellen im Kot wurden jeweils 1 g der frisch entnommenen Kotproben in je 9 ml gepuffertes Pepton-Wasser eingewogen und gründlich suspendiert. Von dieser Suspension wurden 25 µl in Mikrotiterplatten in einer geometrischen Reihe 1:10 verdünnt und auf XLD-Agarplatten ausgetropft. Nach aerober Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 18-24 h konnte die Keimzahl dann durch Auszählen bestimmt werden.

Das verbliebene Peptonwasser wurde zur weiteren Anreicherung ebenfalls bei 37°C für 18-24 h inkubiert, um den qualitativen Nachweis gemäß ISO 6579:2002 führen zu können. Anschließend wurden jeweils 100 µl von jeder Probe im Dreifach-Ansatz auf MSR-V-Medium ausgetropft und für weitere 24-48 Stunden bei 42°C inkubiert. Proben, welche eine Schwärmzone aufwiesen, wurden parallel mittels Glasstab jeweils auf XLD- und BPLS-Agarplatten ausgestrichen und nach einer Inkubation von 18-24 Stunden bei 37°C ausgewertet. Mittels Objektträgerschnellagglutination wurden verdächtig erscheinende Kolonien bestätigt (Agglutinationsseren der Fa. Sifin, Berlin) sowie deren Serotyp identifiziert.

### 3.3.2.2 Organ- und Gewebeproben

Die Untersuchung der Organ- und Gewebeproben (**Tabelle 2**) erfolgte ebenfalls gemäß ISO 6579:2002. Hierzu wurde die steril entnommene Probe zunächst aufgearbeitet und von überschüssigen Geweben befreit. Anschließend wurde sie in Spiritus getaucht und äußerlich mit einem Bunsenbrenner abgeflammt. Danach wurden jeweils 5 g in 45 ml Pepton-Wasser eingewogen und auf höchster Stufe für 2 Minuten im Stomacher 400 (Fa. Seward, London) in einem Stomacherbeutel (Fa. Seward, London) homogenisiert. 25 µl der Suspension wurden in Mikrotiterplatten in einer geometrischen Reihe 1:10 verdünnt und auf XLD-Agarplatten ausgetropft. Nach aerober Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 18-24 h wurde die Keimzahl durch Auszählen bestimmt.

Die verbliebene Suspension wurde zur qualitativen Untersuchung ebenfalls aerob bei 37°C für 18-24 h bebrütet. Anschließend wurden daraus 100 µl als Dreifach-Ansatz auf MSRV-Medium ausgetropft und bei 42°C für 24-48 h inkubiert. Die Proben, welche eine Schwärmzone aufwiesen, wurden dann mittels Glasstab parallel auf XLD- bzw. BPLS-Agarplatten ausgestrichen und weitere 18-24 h bei 37°C bebrütet. Mittels Objektträger-schnellagglutination wurden verdächtig erscheinende Kolonien bestätigt (Agglutinationsseren der Fa. Sifin, Berlin) sowie deren Serotyp identifiziert.

### 3.3.3 Serologische Diagnostik

Als serologisches Testsystem wurde ein isotypspezifischer, indirekter ELISA nach RÖSLER (2007) verwendet. Dazu wurde jeder Infektionsstamm auf je 10 Columbia-Agarplatten (Fa. Oxoid) mit einem Glasspatel ausgestrichen und bei 37°C für 8-10 h bebrütet. Die Kulturen wurden anschließend mit jeweils 4 ml Carbonatpuffer (pH- Wert 9,6) von jeder Platte abgeschwemmt und danach bei 5000 U/min für 10 min zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit Carbonatpuffer wurden alle 3 Bakteriensuspensionen zu gleichen Teilen miteinander vermischt und auf  $5 \times 10^9$  Salmonellenzellen/ ml eingestellt. Davon wurden je 100 µl pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten (Maxisorp®, Fa. Nunc Ltd., Dänemark) einpipettiert und die mit Folie versiegelten Platten anschließend auf einem Horizontal-Schüttler (Typ RCT®, Fa. Ika, Stauffen) mit 300 U/ min für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach

wurden die Platten mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Typ „Ultrawasch II®“, Fa. Dynatech Medical Products Ltd., Guernsey, UK) viermal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen, dann kräftig auf Zellstoffpapier ausgeklopft und bei Raumluft getrocknet. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde in jedes Well 100 µl Blockierungspuffer einpipettiert und die Platten dann erneut für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Schließlich wurden die Platten nochmals viermal gewaschen, dann ausgeklopft und getrocknet. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Platten dann bei -21°C aufbewahrt.

Die Durchführung der ELISA erfolgte entsprechend der Positiv-Referenz-Standardmethode (BUTLER et al. 1978). Als Positivstandard fungierte das Rekonvaleszenten-Serum eines experimentell mit *S. Typhimurium* infizierten Schweins. Für den Negativstandard wurde Serum eines klinisch gesunden und kulturell salmonellenfreien Schweins aus einer Negativ-Kontrollgruppe verwendet (RÖSLER 2004; RÖSLER 2007; MARG 2001). Die Ausgangsverdünnungen der eingesetzten Seren bzw. Konjugate sind der unten aufgeführten **Tabelle 3** zu entnehmen.

**Tabelle 3.** Eingesetzte Serum- bzw. Konjugatverdünnungen

Immunglobulin- Isotyp	Verdünnung Serum	Verdünnung Konjugat
<b>IgA</b>	1:25	1:2500
<b>IgG</b>	1:50	1:8000
<b>IgM</b>	1:50	1:1000

In der Reihe A der Mikrotiterplatte wurden in Spalte 1 100 µl des Negativ -, in der Reihe E in Spalte 1 100 µl des Positivstandards hineinpipettiert. Danach folgten in den Spalten 2 bis 11 der Reihen A und E jeweils 100 µl der verdünnten Seren mit aufsteigendem Probenentnahmedatum. Anschließend wurde mittels 12-Kanalpipette eine geometrische Verdünnungsreihe bis zur Reihe D bzw. H pipettiert, so dass in diesen eine Verdünnung von 1:200 für IgA, entsprechend 1:400 für IgG und IgM vorlag. Die darauf folgende Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min auf dem Schüttler, wonach ein viermaliger Waschschrift mit PBS durchgeführt wurde. Im Anschluss wurden folgende affinitätsgereinigte, polyvalente,

monospezifische, peroxidasekonjugierte Hyperimmunseren als sekundäre Antikörper eingesetzt: Ziege-Anti-Schwein IgA, Ziege-Anti-Schwein IgG-Fc (h-l) und Ziege-Anti-Schwein IgM (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Die für die entsprechenden Konjugate beste Gebrauchsverdünnung wurde über eine „Checkerboard“-Konjugatauswertung (engl. Checkerboard = Schachbrett) ermittelt und in PBS-Tween 20®, 0,05 %ig (vol/vol) verdünnt zu je 100 µl in jedes Well einpipettiert. Es folgte die Inkubation von 30 min bei 37°C auf dem Schüttler sowie ein Waschschriff mit PBS-Tween 20®. Zum Entwickeln der Platten wurde in jedes Well die peroxidhaltige und auf dem Farbstoff ABTS (Fa. Boehringer, Mannheim) basierende Substratlösung pipettiert und die Reaktion nach 15 min Inkubation im ELISA-Reader automatisch abgelesen. Dazu wurde in einem computergesteuerten Plattenphotometer (Typ „Multiscan Ascent®“, Fa. Labsystems, McLean, USA) bei einer Wellenlänge von 630 nm die optische Dichte (OD) jeder Probe bestimmt und die Antikörperaktivitäten mittels der Software SalmoSoft™ (Labor Diagnostik GmbH Leipzig) unter Anwendung der Referenzstandardmethode (BUTLER et al. 1978) ermittelt.

### 3.3.4 Statistische Auswertung

Die Salmonellenausscheidungs- und Organbesiedlungsraten, die isotypspezifischen Antikörperaktivitäten, die Differentialblutbilder sowie die blutchemischen Parameter wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Infektionsstatus der Tiere größtenteils durch sogenannte „Notch-Boxen“ (engl. notch = Keil), einer graphischen Darstellungsform aus der deskriptiven Datenanalyse, visualisiert. Hierbei erfolgt die Abbildung des Median, des unteren und oberen Quartils (horizontale Begrenzung des Keils), der 95 % Konfidenzgrenze (schräge Begrenzung der Figur) sowie der Extremwerte (MCGILL et al. 1978). Die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen erfolgte mittels des Student's *t*-Tests, des Tests nach Welch sowie des Tests nach Man-Whitney. Hierbei wurde eine Signifikanzgrenze von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Untersuchung

Die Klinische Untersuchung der Versuchstiere erfolgte während des gesamten Versuches täglich. Zur Beurteilung wurden die Parameter Gesamtklinisches Bild, Innere Körpertemperatur, Kotkonsistenz bzw. Durchfall, Allgemeinbefinden sowie Futteraufnahme herangezogen und nach einem Score (0 = klinisch o.b.B, 1 = geringgradig verändert, 2 = mittelgradig verändert, 3 = hochgradig verändert) bewertet.

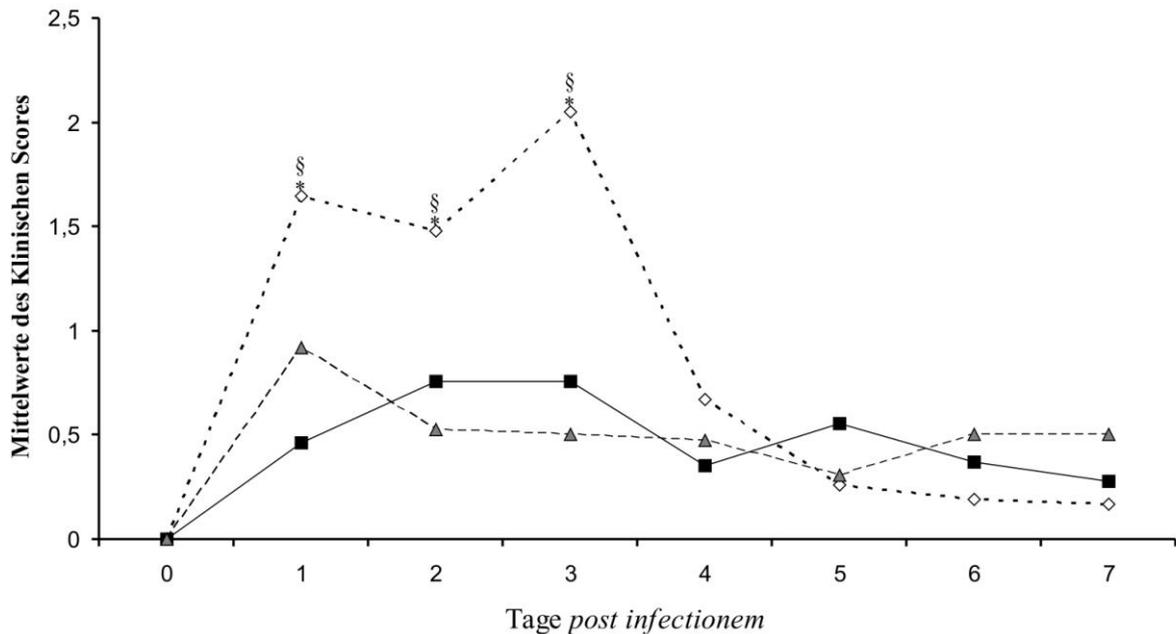
Nach der experimentellen Infektion zeigte die mit *S. Infantis* infizierte Gruppe die signifikant stärksten klinischen Symptome, welche jedoch am zeitigsten wieder abklagen.

Bei den anderen beiden Infektionsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede zueinander feststellbar. Die Tiere dieser beiden Gruppen entwickelten nur eine moderate Klinik, die jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum bestand (**Abbildung 3**).

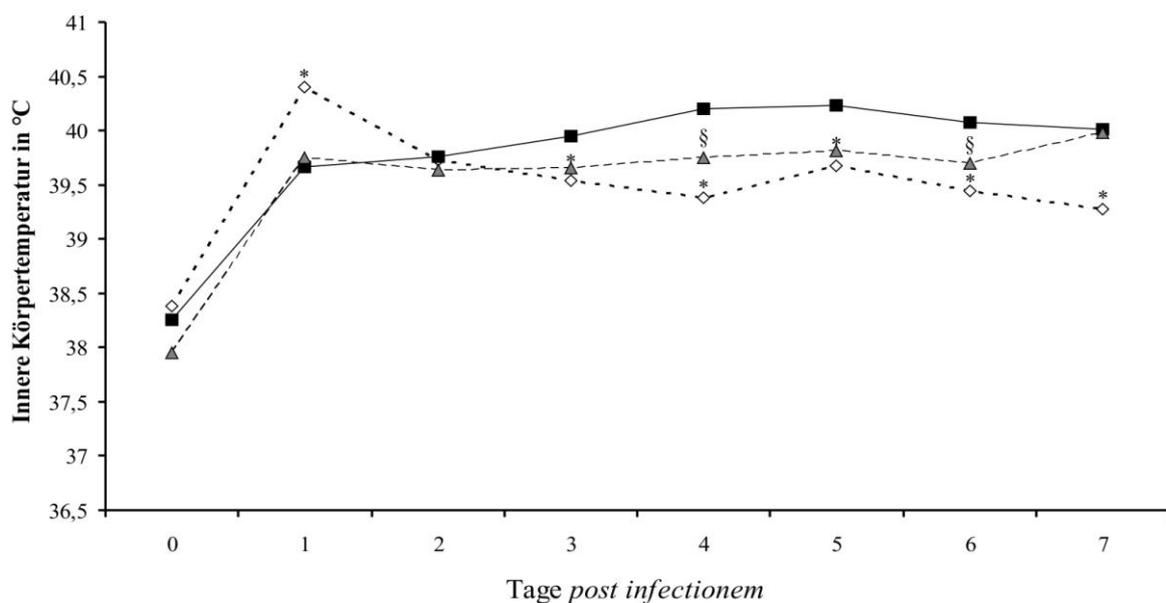
Der Verlauf der Körpertemperatur wies bei der *S. Infantis*-Infektionsgruppe den steilsten Anstieg auf, sank aber zum Ende hin kontinuierlich ab. Die anderen beiden Gruppen hingegen zeigten einen nur mäßigen Anstieg, dafür aber eine kontinuierliche Steigerung der Körpertemperatur bis hin zum Versuchsende (**Abbildung 4**). Die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe zeigte insgesamt die höchsten Fieberwerte über den gesamten Messzeitraum hinweg.

Bei Betrachtung der Kotkonsistenz, des Allgemeinbefindens und auch der Futteraufnahme wies die *S. Infantis*-Gruppe die deutlichsten signifikanten Veränderungen ( $p < 0,05$ ) auf. Der Kot war wässrig-gelb bis grau. Auffällig war, dass die genannten Symptome am Tag 4 nach dem Challenge bei diesen Tieren am frühesten wieder verschwanden und eine Besserung eintrat (**Abbildungen 5, 6 und 7**).

Hingegen waren bei den anderen beiden Infektionsgruppen (*S. Typhimurium* DT104-Gruppe und *S. Derby*-Gruppe) keine wesentlichen Unterschiede zueinander feststellbar. Die klinischen Symptome waren insgesamt geringer ausgeprägt als bei der *S. Infantis*-Infektionsgruppe, hielten dafür aber über einen längeren Zeitraum an.

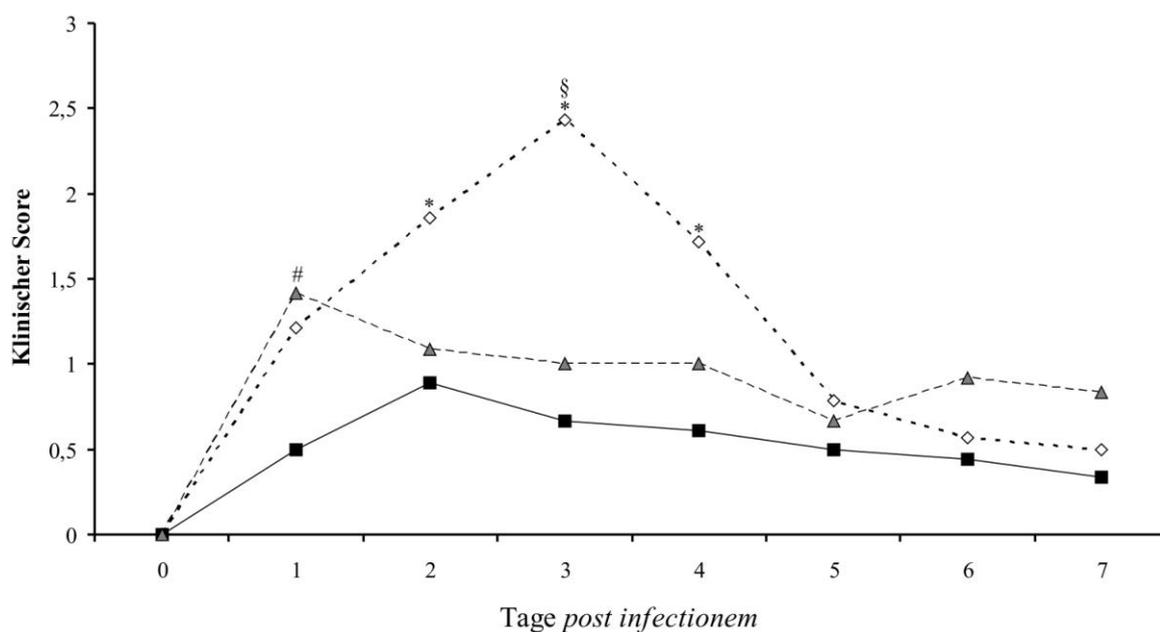


**Abbildung 3.** Zusammenfassung der Mittelwerte des klinischen Scores nach experimenteller Infektion der Schweine mit *S. Infantis* (weiß, gepunktete Linie), *S. Typhimurium* DT104 (schwarz, durchgehende Linie) und *S. Derby* (grau, gestrichelte Linie). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

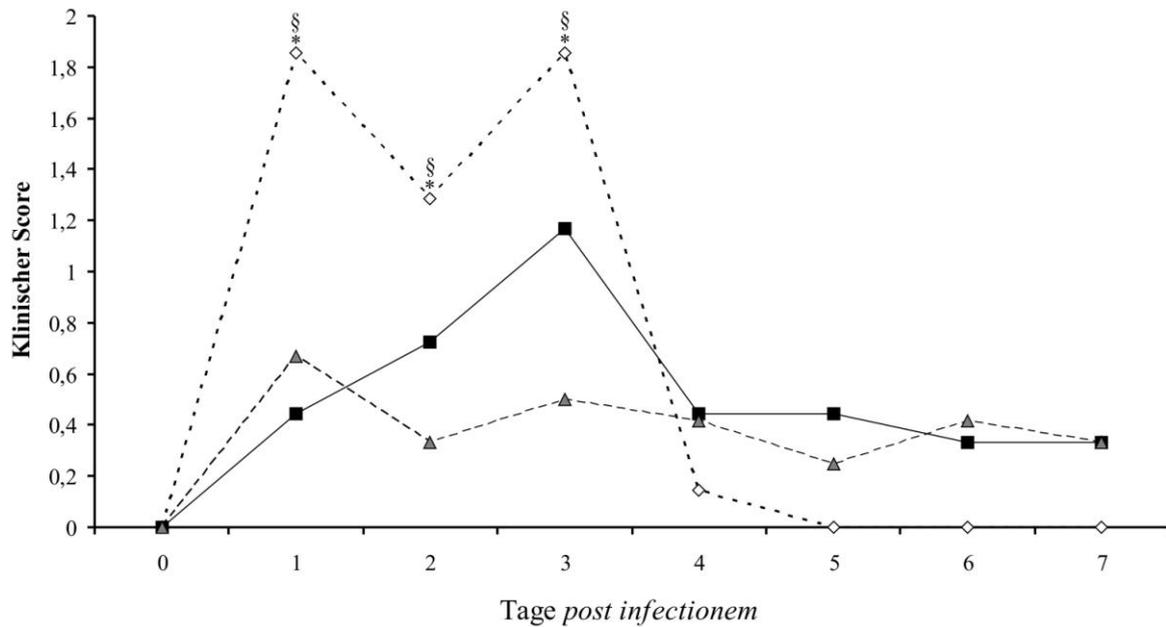


**Abbildung 4.** Verlauf der Inneren Körpertemperaturen nach experimenteller Infektion der Schweine mit *S. Infantis* (weiß, gepunktete Linie), *S. Typhimurium* DT104 (schwarz,

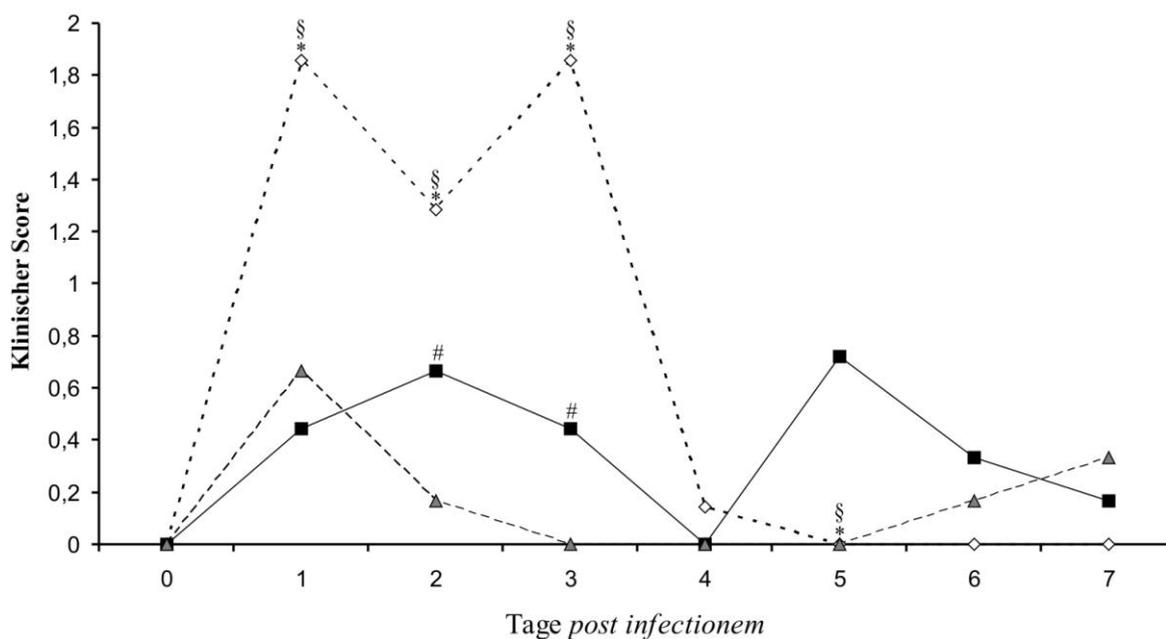
durchgehende Linie) und *S. Derby* (grau, gestrichelte Linie). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 5.** Durchfallsymptomatik nach experimenteller Infektion der Schweine mit *S. Infantis* (weiß, gepunktete Linie), *S. Typhimurium* DT104 (schwarz, durchgehende Linie) und *S. Derby* (grau, gestrichelte Linie). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 6.** Allgemeinbefinden nach experimenteller Infektion der Schweine mit *S. Infantis* (weiß, gepunktete Linie), *S. Typhimurium* DT104 (schwarz, durchgehende Linie) und *S. Derby* (grau, gestrichelte Linie). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 7.** Futteraufnahme nach experimenteller Infektion der Schweine mit *S. Infantis* (weiß, gepunktete Linie), *S. Typhimurium* DT104 (schwarz, durchgehende Linie) und *S.*

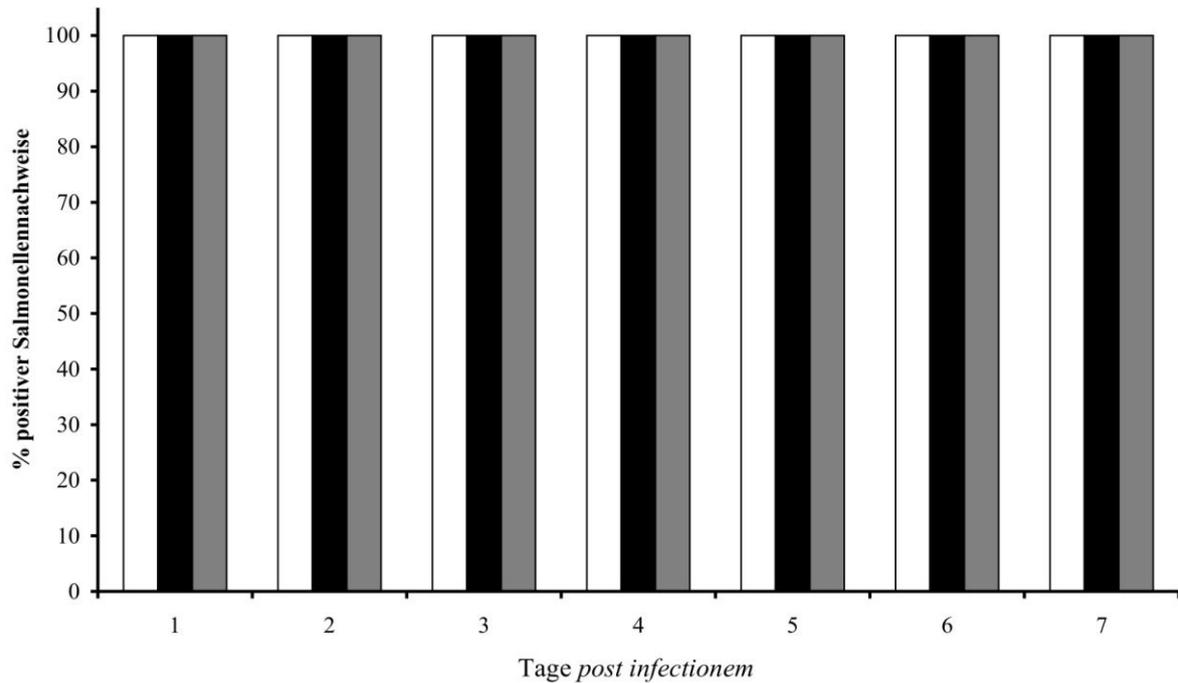
Derby (grau, gestrichelte Linie). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Ausscheidung der Challengestämmen

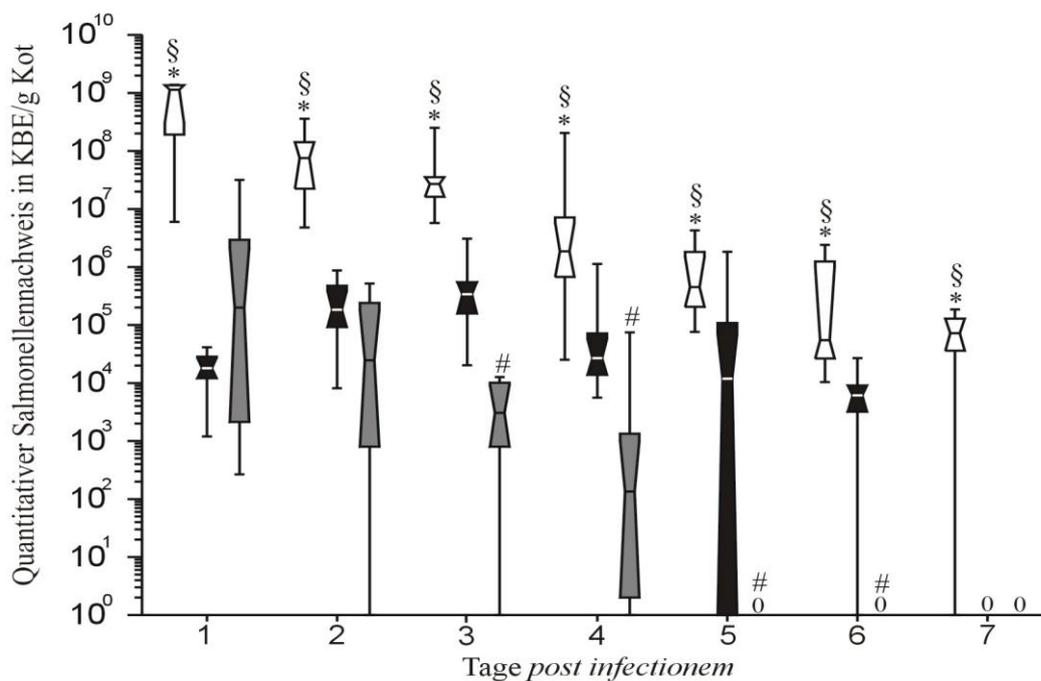
Die qualitative bakteriologische Untersuchung offenbarte keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Alle Tiere schieden zu allen Zeitpunkten des Experiments den jeweiligen Infektionsstamm aus (**Abbildung 8**).

Bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung der täglich entnommenen Kotproben wurden hingegen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sichtbar (**Abbildung 9**).

Die *S. Infantis*-Gruppe schied zu allen Zeitpunkten des Experiments signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr koloniebildende Einheiten des Infektionsstammes aus als die Tiere der anderen beiden Gruppen. Die Ausscheidung hielt bis zum Ende des Experimentes an, wobei ein stetiger linearer Abfall zu beobachten war. Dieser Abfall zeigte sich ebenso bei den zwei anderen Gruppen, wobei die Ausscheidung der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe ab Tag 3 *post infectionem* signifikant höher war als die der *S. Derby*-Gruppe.



**Abbildung 8.** Salmonellen-Ausscheidungsrate der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) in den Faeces nach Anreicherung.

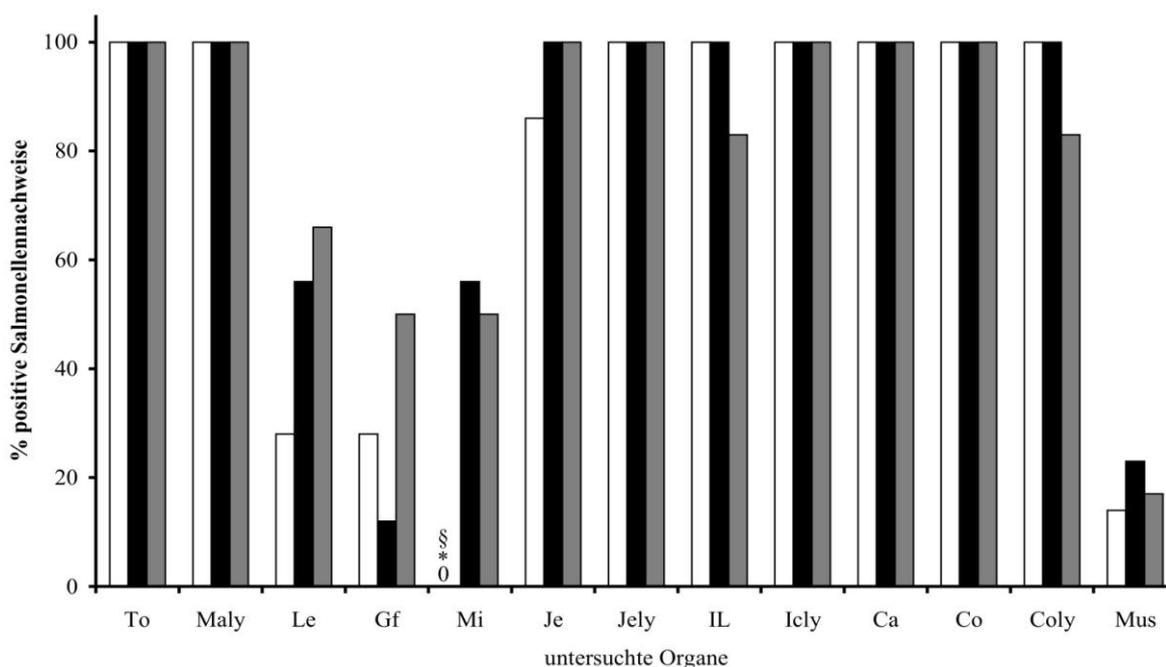


**Abbildung 9.** Quantitative Ausscheidung des Infektionsstammes der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und *S. Derby*-Gruppe (grau).

\*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). 0, kein quantitativer Nachweis möglich.

### 4.3 Organbesiedlung der Challengestämmen

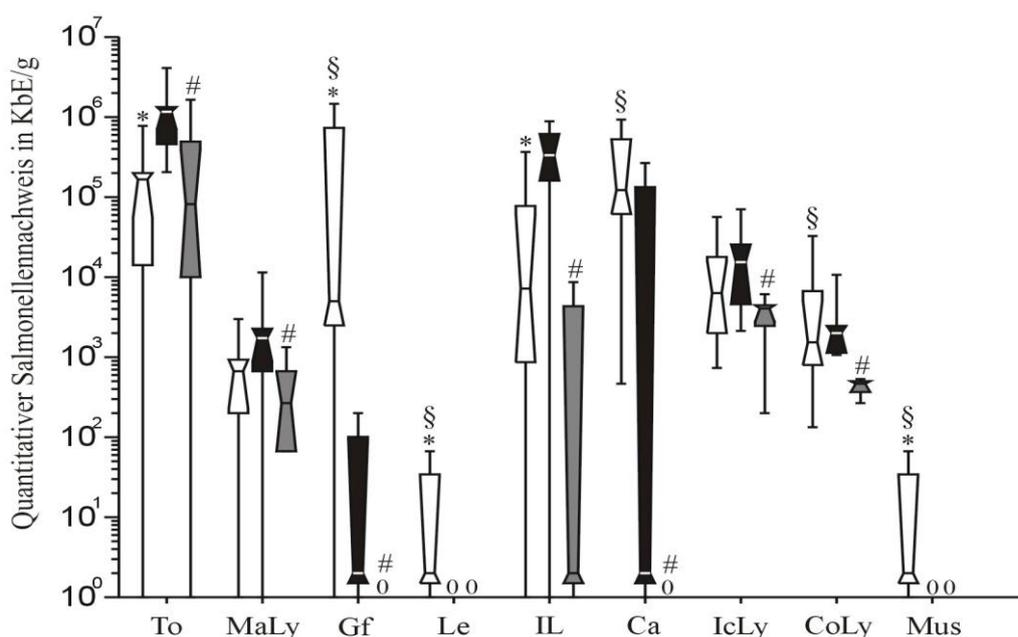
Die qualitative bakteriologische Untersuchung der nach der Schlachtung entnommenen, infektiologisch relevanten Organproben ergab ausschließlich in der Milz signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen. So konnte der Infektionsstamm bei der *S. Infantis*-Gruppe in der Milz nicht nachgewiesen werden, wohl aber bei den beiden anderen Gruppen. In den übrigen lymphatischen Geweben wurde der Infektionsstamm bei fast allen Tieren nachgewiesen, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und den beiden anderen Gruppen gab. Bei den Darmabschnitten hatte die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe hingegen die höchste Befallsrate. Insgesamt war die Salmonellen-Isolationsrate bei der *S. Derby*-Gruppe am höchsten, bei der *S. Infantis*-Gruppe am geringsten (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10.** Kolonisierungsrate des Infektionsstammes bei der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und *S. Derby*-Gruppe (grau). \*, signifikanter

Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). 0, kein qualitativer Nachweis möglich

Die quantitative bakteriologische Untersuchung der Organproben ergab zum Teil sehr große signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsgruppen. In den extraintestinalen und für den menschlichen Verzehr bestimmten Organen Leber und Muskulatur war ein quantitativer Nachweis des Infektionsstammes lediglich bei der *S. Infantis*-Gruppe möglich. Ebenso erbrachte der Nachweis in der Gallenflüssigkeit signifikant höhere Salmonellenzahlen bei der *S. Infantis*-Gruppe als bei den beiden anderen Gruppen. In den lymphatischen Geweben hingegen erreichte der *S. Typhimurium* DT104-Infektionsstamm fast immer die höchsten Werte. Vor allem in der Tonsille erreichte er eine signifikant höhere Kolonisierungsrate als die anderen beiden Stämme. Der quantitative Nachweis des *S. Derby*-Infektionsstammes fiel in fast allen untersuchten Organen am geringsten aus (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11.** Quantitativer Salmonellennachweis des jeweiligen Infektionsstammes bei der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und *S. Derby*-Gruppe (grau). \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium*

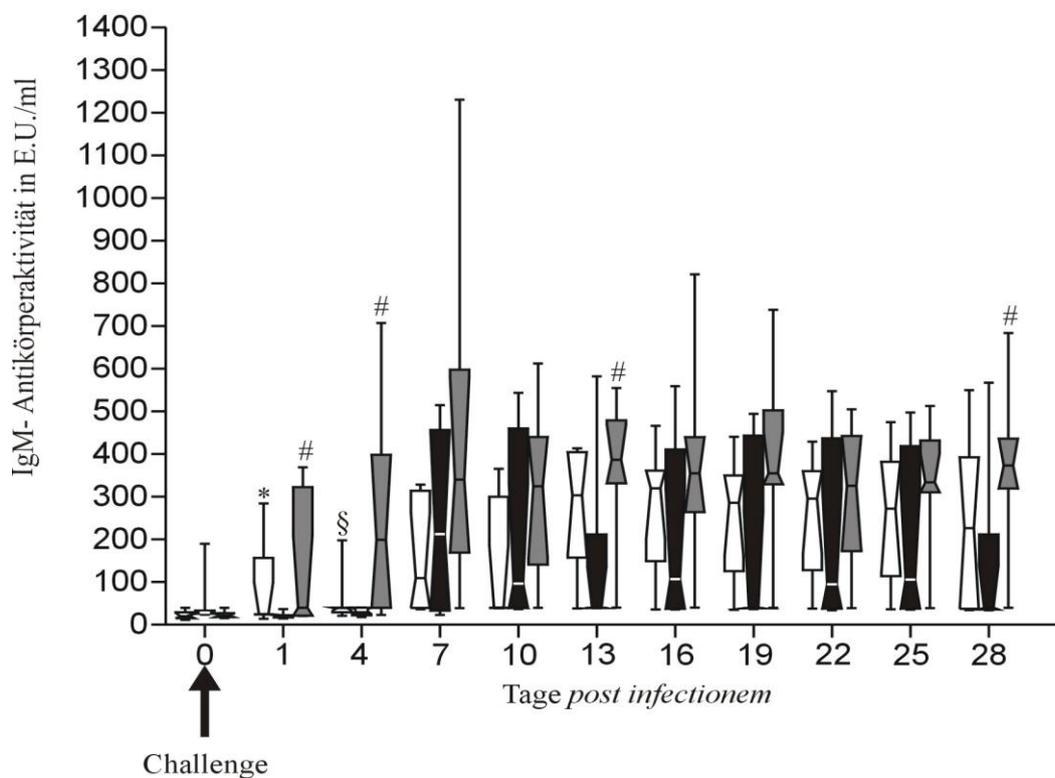
DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). 0, kein quantitativer Nachweis möglich.

Bei allen Tieren der drei Infektionsgruppen war in den Proben von Milz, Jejunum, Jejunal-Lymphknoten und Colon kein quantitativer Salmonellennachweis möglich.

#### 4.4 Humorale Immunantwort

Zur blutserologischen Untersuchung wurden Seren von Tieren aus Langzeit-Infektionsversuchen verwendet, die parallel mit denselben Infektionsstämmen und gleichem Infektionsmodell infiziert wurden (ROESLER, 2007; SZABO et al., 2008). Das untersuchte Zeitfenster reichte dabei bis zur 4. Woche *post infectionem*. Die Messung der Antikörperaktivitäten erfolgte Isotypspezifisch für IgM, IgG und IgA, wobei die spezifischen Aktivitäten von IgA bei allen Tieren der drei Gruppen stets unterhalb der Nachweisgrenze lagen und somit nachfolgend nicht abgebildet sind.

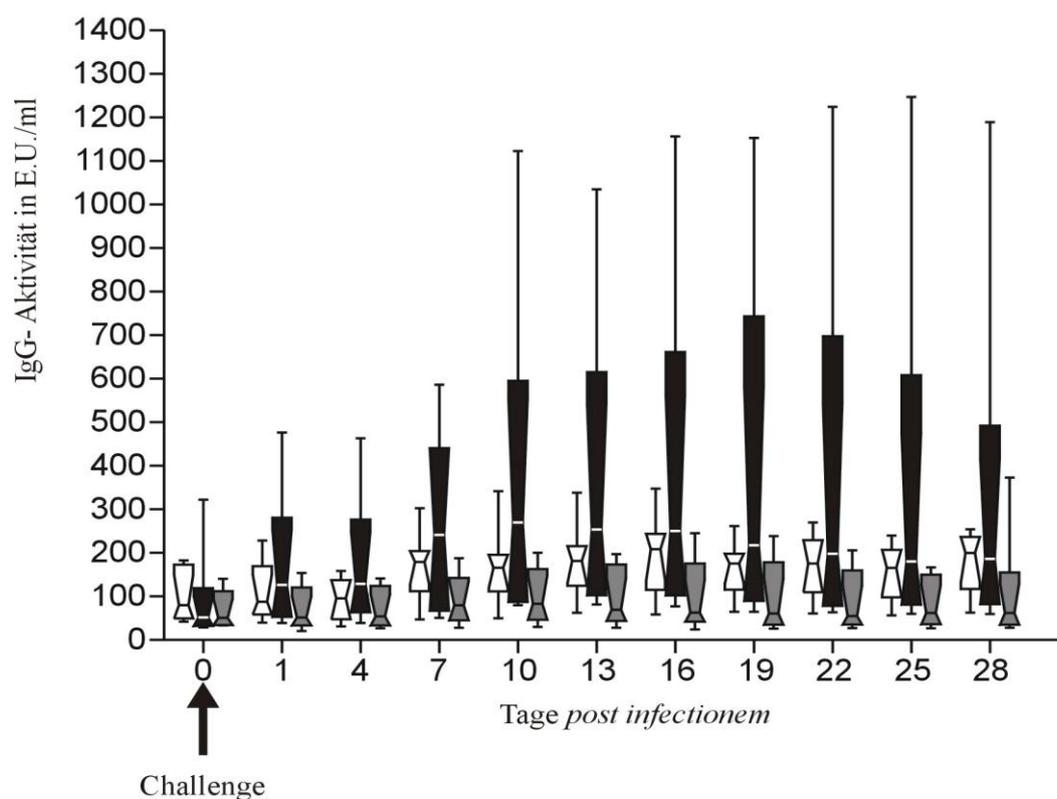
Die Antikörper-Aktivität von IgM war bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe bis zum 4. Tag nach der Infektion signifikant niedriger als die der anderen beiden Gruppen. Die Maxima der IgM-Aktivitäten lagen bei allen 3 Gruppen zwischen dem 7. und 13. Tag *post infectionem*. Danach sanken die spezifischen IgM-Aktivitäten leicht ab und stagnierten bis zum Ende des Experiments. Insgesamt erreichte die *S. Derby*-Gruppe die höchsten spezifischen IgM-Aktivitäten (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12.** Salmonellen-spezifische IgM-Antikörperaktivitäten der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und *S. Derby*-Gruppe (grau).

\*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Die spezifischen Antikörperaktivitäten für IgG offenbarten jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsgruppen. Die Antikörperspiegel stiegen bei allen Gruppen langsam an, erreichten ihr Maximum um den 16. bis 19. Tag nach der Infektion und fielen danach bis zum Ende des Experiments wieder ab. Die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe wies dabei stets die höchste IgG-Aktivität auf. Insgesamt offenbarten die Tiere der *S. Infantis*- und der *S. Derby*-Gruppe nur sehr geringe Anstiege der IgG-Antikörperaktivität (**Abbildung 13**).

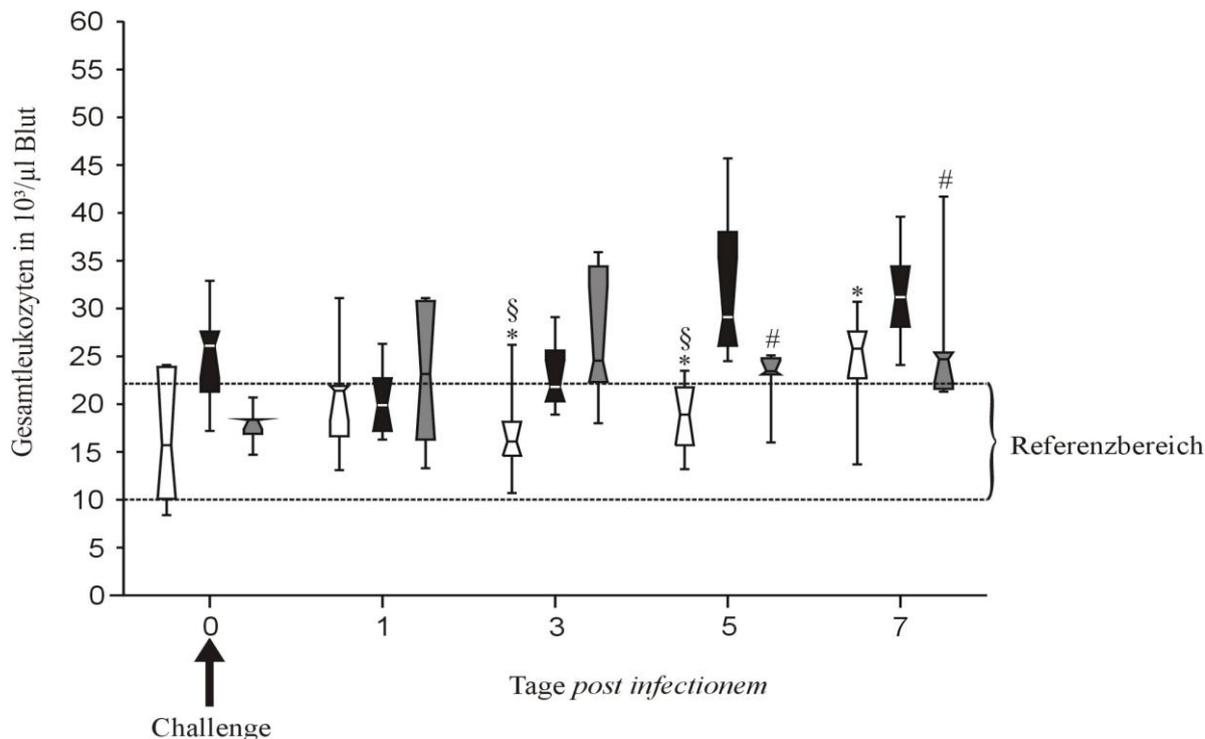


**Abbildung 13.** Salmonellen- spezifische IgG- Antikörperaktivitäten der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*- Gruppe (grau) im Blutserum.

## 4.5 Differentialblutbild

### 4.5.1 Gesamtleukozyten

Die Gesamtleukozytenzahl schwankte in ihrem Verlauf zwischen den drei Gruppen und es ergaben sich signifikante Unterschiede besonders gegen Ende des Experiments hin. So war die Gesamtleukozytenzahl der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe ab dem 5. Tag *post infectionem* bis zum Ende signifikant höher als bei den anderen Gruppen. Insgesamt betrachtet stieg die Gesamtleukozytenzahl sowohl bei der *S. Derby*-Gruppe als auch bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe bis zum Tag 3 bzw. 5 nach der Infektion an, um zum Ende hin wieder leicht abzufallen. Bei der *S. Infantis*-Gruppe hingegen stieg der Spiegel bis zur Schlachtung kontinuierlich an. Am letzten Tag des Experiments entwickelten fast alle Tiere der drei Infektionsgruppen eine Leukozytose (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14.** Gesamtleukozytenzahl der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) im Blutplasma während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und

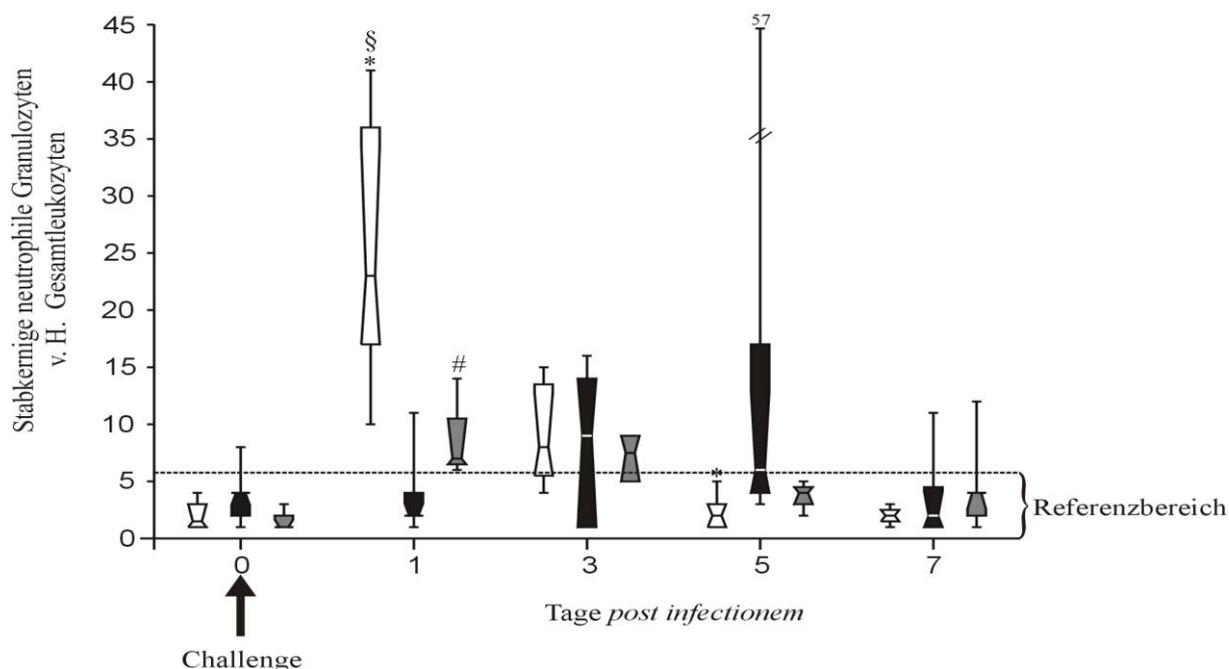
der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2 Stabkernige neutrophile Granulozyten

Bei Betrachtung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten traten ebenfalls teilweise deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zum Vorschein.

Die *S. Infantis*-Gruppe erreicht einen Tag nach der Infektion den höchsten Spiegel, der signifikant höher ist als bei den anderen Gruppen und somit die stärkste Linksverschiebung zeigt. Danach fällt die Anzahl der stabkernigen neutrophilen Granulozyten wieder ab und befindet sich zum Ende des Experiments wieder im Referenzbereich. Einen ähnlichen Verlauf, wenn auch dezenter, zeigt auch die *S. Derby*-Gruppe.

Anders verhält sich hingegen die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe, deren Spiegel bis zum 5. Tag *post infectionem* ansteigt, um dann wieder in den Referenzbereich abzusinken. Insgesamt reagieren die Tiere aller drei Infektionsgruppen nach dem Challenge mit einer Linksverschiebung, die bei den mit *S. Infantis* infizierten Tieren insgesamt am deutlichsten ausfällt (**Abbildung 15**).

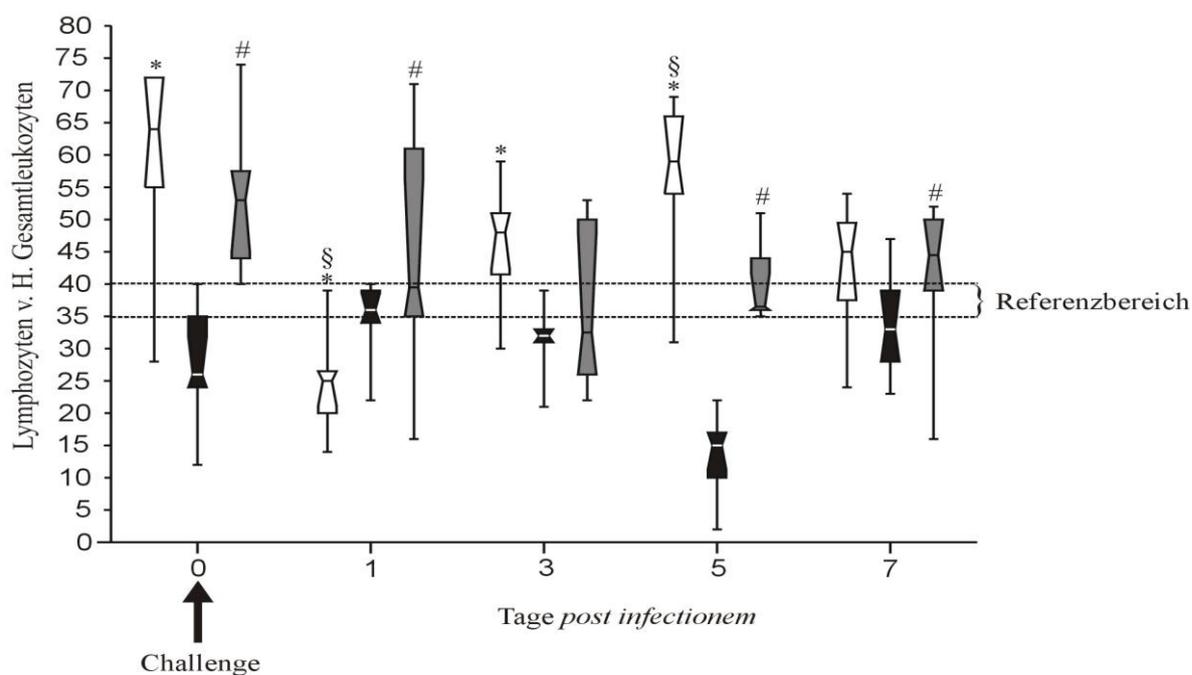


**Abbildung 15.** Anteil der stabkernigen neutrophilen Granulozyten der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) am Differentialblutbild während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.3 Lymphozyten

Bei Betrachtung der mononukleären Zellen ist auch bei den Lymphozyten eine unterschiedliche Kinetik zwischen den einzelnen Infektionsgruppen zu beobachten, wobei es aber schon zu Beginn des Experiments signifikante Unterschiede gab. So wiesen der Infektion sowohl die *S. Infantis*- als auch die *S. Derby*-Gruppe eine Lymphozytose auf und haben signifikant höhere Lymphozytenzahlen als die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe, die ihrerseits eine leichte Lymphopenie zeigt. Die Lymphozytenzahl der *S. Infantis*-Gruppe sinkt einen Tag nach der Infektion jedoch signifikant unter den der anderen Gruppen ab, steigt dann wieder stark an, um sich zum Ende des Experiments wieder im Normalbereich einzupegeln. Auch die Lymphozytenkurve der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe sinkt zunächst deutlich ab, weist am

5. Tag *post infectionem* die signifikant stärkste Lymphopenie aller drei Infektionsgruppen auf und kehrt dann wieder in den Referenzbereich zurück. Die Tiere der *S. Derby*-Gruppe wiesen hingegen nur geringe Schwankungen innerhalb des Referenzbereiches auf (**Abbildung 16**).

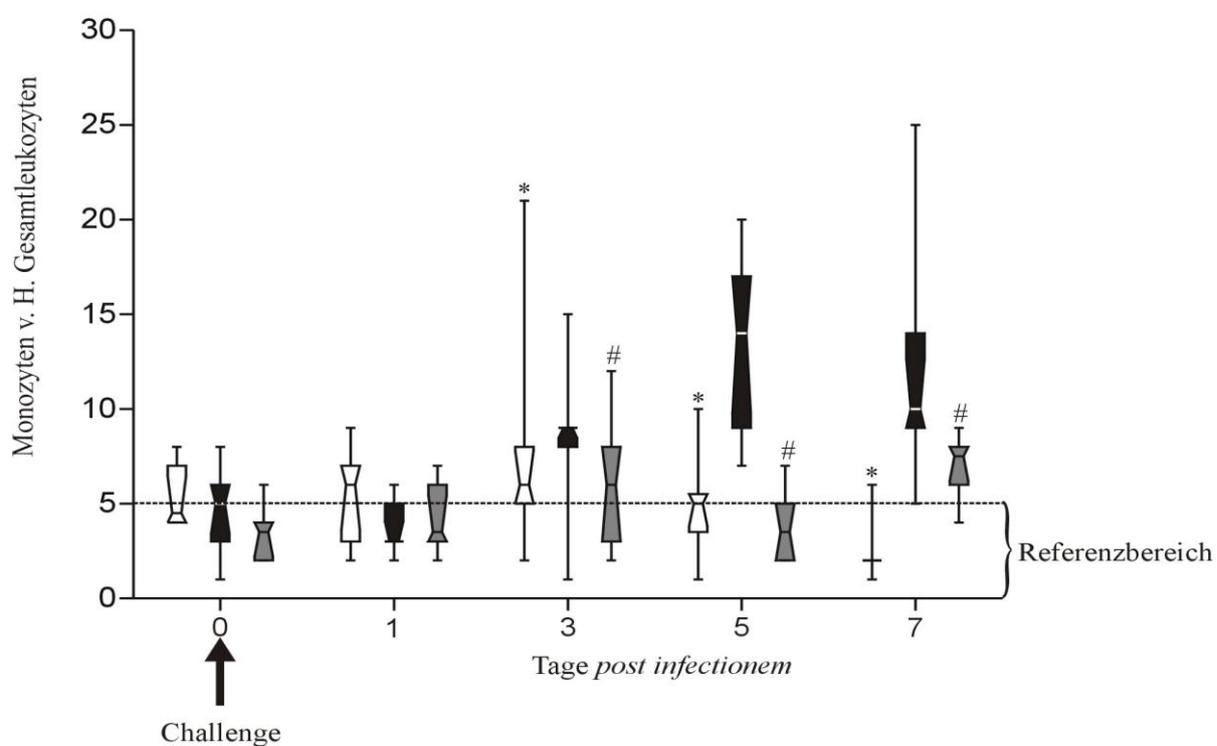


**Abbildung 16.** Anteil der Lymphozyten der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) am Differentialblutbild während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.4 Monozyten

Bei den Monozytenspiegeln zeigen die *S. Infantis*-Gruppe und die *S. Derby*-Gruppe einen ähnlichen Verlauf mit einem leichten Anstieg am 3. Tag nach der Infektion und anschließendem Rückgang in den Referenzbereich bis zum Ende des Experiments.

Anders verhält es sich bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe. Hier steigt die Monozytenzahl kontinuierlich stark an und ist ab dem 3. Tag *post infectionem* signifikant höher als bei den anderen Gruppen (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17.** Anteil der Monozyten der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) am Differentialblutbild während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

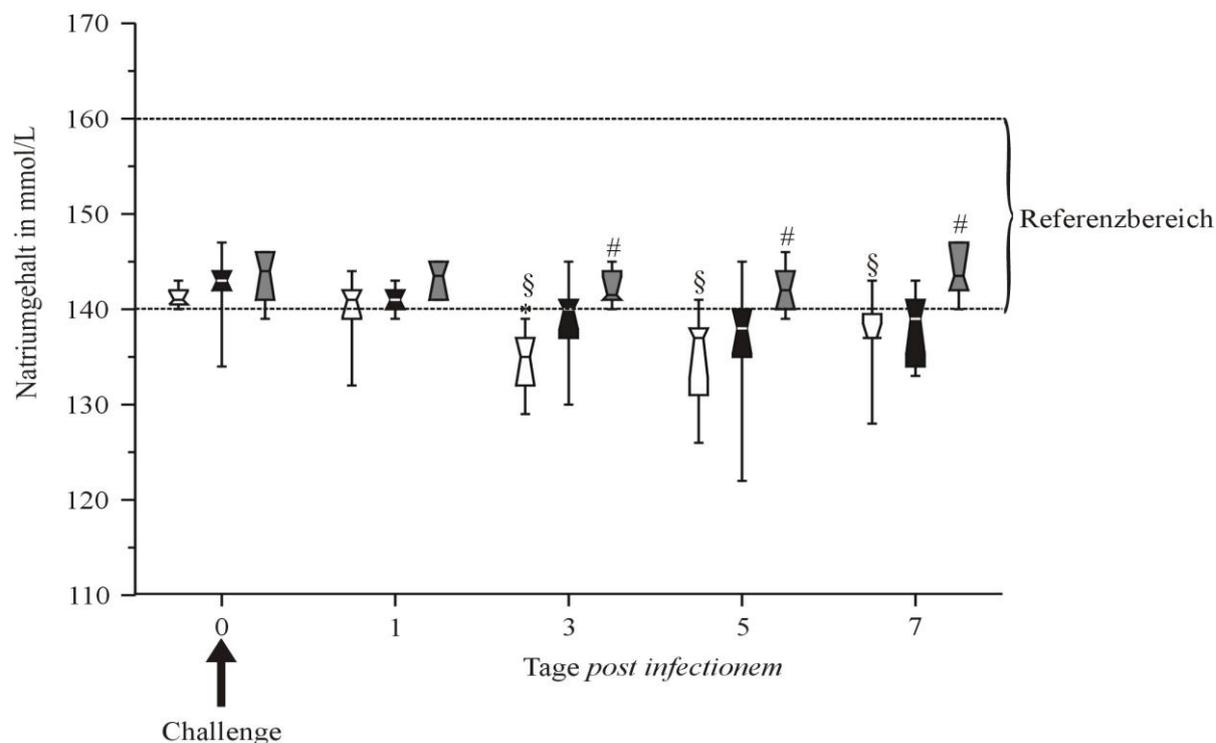
## 4.6 Blutchemie

Neben den Parametern des weißen Blutbildes erfolgte auch die Untersuchung der drei Elektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid.

Bei den Elektrolyten konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Bei der *S. Infantis*- und der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe stellte sich im Verlauf des Experiments eine leichte Hyponaträmie und Hypochlorämie ein (**Abbildungen 18** und **20**).

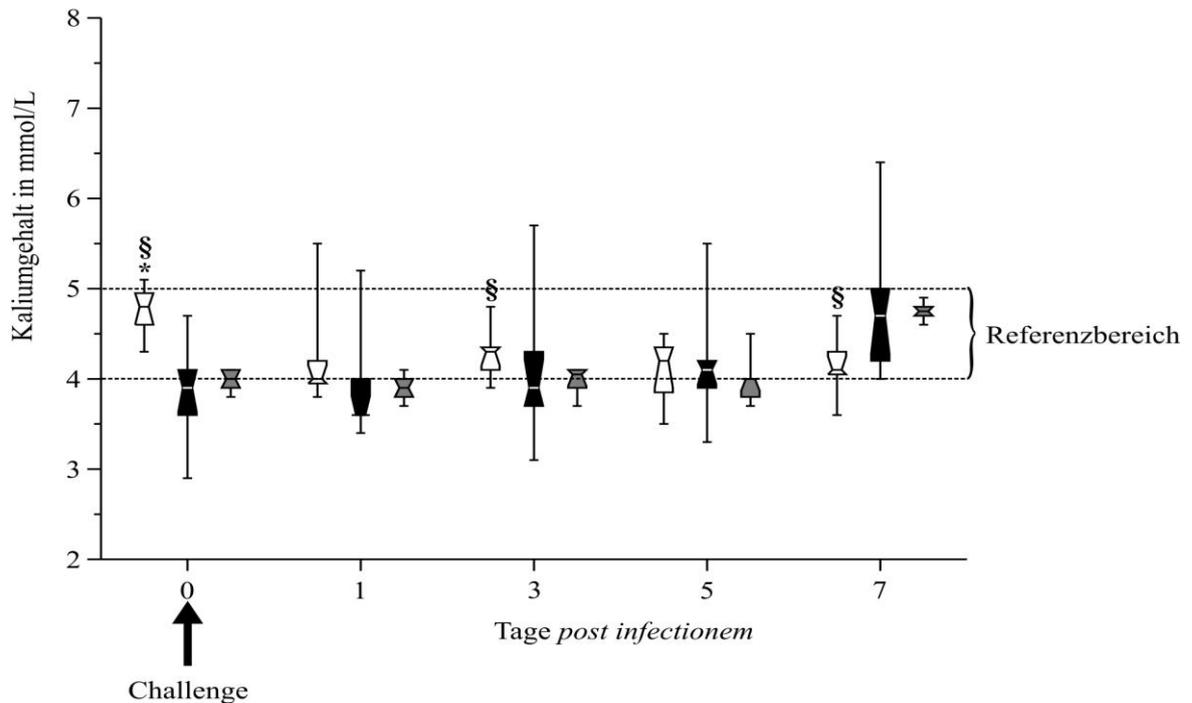
Bei der *S. Derby*-Gruppe zeigten sich hingegen im Laufe des Experiments keine Elektrolytimbalancen.

#### 4.6.1 Natriumgehalt



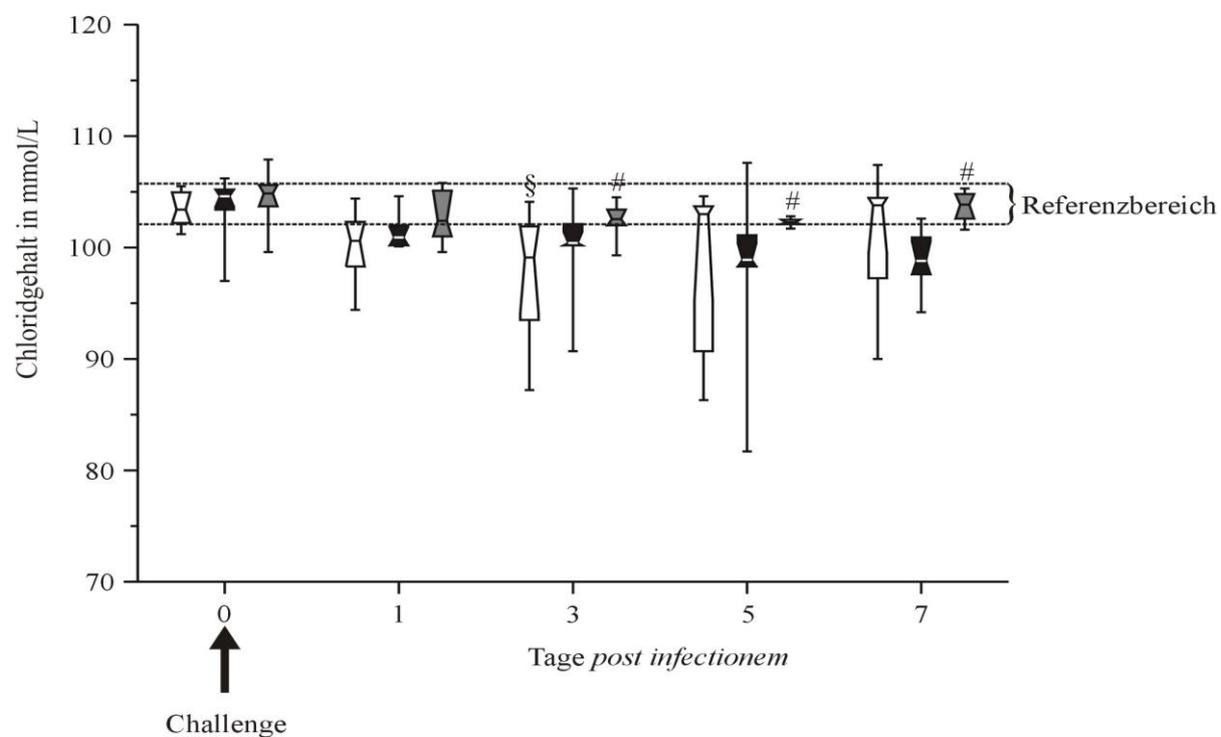
**Abbildung 18.** Natriumgehalt der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) im Blutplasma während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2 Kaliumgehalt



**Abbildung 19.** Kaliumgehalt der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) im Blutplasma während des Experiments. \*, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

### 4.6.3 Chloridgehalt



**Abbildung 20.** Chloridgehalt der *S. Infantis*-Gruppe (weiß), der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe (schwarz) und der *S. Derby*-Gruppe (grau) im Blutplasma während des Experiments. #, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ). §, signifikanter Unterschied zwischen der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

## 5 Diskussion

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte die Salmonelleninfektion des Schweins näher charakterisiert werden. Dabei wurden die drei in Deutschland beim Schwein bedeutsamsten *Salmonella enterica*-Serovaren Infantis, Typhimurium und Derby berücksichtigt und durch eine vergleichende Untersuchung des Klinischen Bildes, der Erregerausscheidung, des Kolonisationsverhaltens sowie der zellulären und humoralen Immunantwort konnten wichtige Erkenntnisse zur Pathogenität und Pathogenese der einzelnen Serovaren beim Schwein gewonnen werden. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich weitgehend auf die Serovar *S. Typhimurium* und sind meist im Maus- und Hühnermodell durchgeführt worden. Dies kann jedoch nur eingeschränkt auf das Schwein übertragen werden. Da jedoch über 20 % der humanen Salmonellen-bedingten Enteritiden auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückzuführen ist, stellt die porcine Salmonelleninfektion ein ernst zu nehmendes Problem für den Verbraucher dar. Dabei spielen vor allem nicht wirtsspezifische Salmonellen eine Rolle, da hier die Infektion beim Schwein überwiegend symptomlos verläuft. Diese Arbeit ist die erste Studie, bei der systematisch die Infektionskinetik der drei wichtigsten Schweine-Salmonellen-Serovaren vergleichend untersucht wurde. Die gewonnenen Ergebnisse erweitern die Kenntnisse zur Pathogenese von Salmonelleninfektionen des Schweins und können mit dazu beitragen, den Eintrag von Salmonellen in die Lebensmittelkette zu verringern, um somit einen verbesserten Verbraucherschutz zu gewährleisten.

### 5.1 Klinik

Bei bisher an Schweinen durchgeführten Infektionsversuchen mit *S. Typhimurium* DT104 manifestierten sich mittel- bis hochgradige klinische Symptome einer Salmonellose, z.T. mit septikämischen Erscheinungen und Verendungen der Tiere (RÖSLER et al. 2004; BRUMME et al. 2007). Bei vergangenen Infektionsversuchen mit den Serovaren Infantis und Derby waren diese Serovare kaum invasiv und nur schwach virulent (FOSTER et al. 2003; LOYNACHAN et al. 2004). Jedoch wurden dafür zum Teil nicht natürliche Infektionsrouten

gewählt und außerdem wurde mit einer zu kleinen Anzahl an Versuchstieren gearbeitet, wodurch die ermittelten Ergebnisse nur eine beschränkte Aussagekraft haben und schwer zu verallgemeinern sind.

Die fehlende Invasivität und schwache Virulenz von *S. Infantis* konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden, da die klinischen Befunde bei der *S. Infantis*-Infektionsgruppe deutlich stärker waren als bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe.

Die *S. Infantis*-Gruppe zeigte mit dem typischen wässrig-gelben Durchfall, dem deutlich reduzierten Allgemeinbefinden, der reduzierten Futteraufnahme sowie dem auftretenden Fieber typische Symptome einer Salmonellose. Bei dieser Infektionsgruppe zeigte sich 24 Stunden nach der Infektion außerdem Erbrechen. Diese Symptome verschwanden jedoch bei der *S. Infantis*-Gruppe bereits vier Tage nach der Infektion. Danach waren nahezu alle Tiere dieser Gruppe bis zum Versuchsende ohne besonderen Befund.

Sowohl die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe als auch die *S. Derby*-Gruppe offenbarten hingegen nur geringgradige Symptome einer Salmonellose und unterschieden sich im Verlauf nur wenig zueinander. Jedoch war die Körpertemperatur bei beiden Infektionsgruppen über den gesamten Messzeitraum hinweg erhöht. Dabei erreichte die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe insgesamt die höchsten Körpertemperaturen aller drei Gruppen.

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass eine manifeste Salmonellose durch nicht wirtsspezifische Salmonellen häufig nur bei prädisponierenden Faktoren auftritt, sie ähnelt jedoch dann einer *S. Cholerasuis*-Infektion, welche durch reduziertes Allgemeinbefinden, Fieber, Diarrhoe und mitunter pneumonischen Symptomen geprägt ist (SELBITZ et al. 1995).

Der Grund für die stark ausgeprägte Klinik bei der *S. Infantis*-Infektionsgruppe ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Virulenz des verwendeten Infektionsstammes zurückzuführen, da dieser primär aus einer Perikarditis vom Schwein isoliert wurde und somit bereits als invasiv zu werten ist.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte eine Organbesiedlungsrate von über 70 % ermittelt werden, was *S. Infantis* als invasiven Erreger, der dazu noch mit einer deutlichen Klinik beim Schwein einhergehen kann, eine große Bedeutung zukommen lässt, auch wenn in Deutschland nur etwa 2,5 % der Schweine Träger von *S. Infantis* sind. Denn auch beim Menschen kann eine *S. Infantis*- Infektion vom Schwein mit schweren klinischen Verläufen und sogar Todesfällen einhergehen, wie es 1993 in Dänemark geschehen war. Daraufhin wurde das dänische Salmonellenprogramm ins Leben gerufen, was auch heute noch eine

Vorreiterrolle bei der Salmonellenbekämpfung in der gesamten Europäischen Union hat (NIELSEN et al. 2001).

Die bisherigen Untersuchungen zu *S. Infantis* lassen jedoch den Schluss zu, dass es innerhalb dieser Serovar erhebliche Virulenzunterschiede gibt.

Für *S. Derby* konnte in unserer Studie hingegen nur eine geringe Virulenz nachgewiesen werden.

## 5.2 Ausscheidung des Challengestammes und Kolonisierungsraten

Der kulturelle Nachweis von *Salmonella* in Faecesproben erfolgte nach dem standardisierten Verfahren nach ISO 6579:2002. Die Kotproben wurden in einem kontinuierlichen und engen Abstand entnommen, um eine sichere Aussage über die Dauer sowie die Quantität der Ausscheidung treffen zu können (VON ALTROCK et al. 2000). Generell können persistent infizierte Schweine für einige Wochen bis Monate Salmonellen ausscheiden und jederzeit nach Einwirkung von Stress diesen Status wieder erlangen (WOOD et al. 1989; SCHERER et al. 2008).

Aufgrund der geringgradigen klinischen Symptome bestand insbesondere bei der *S. Derby*-Infektionsgruppe aber auch bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe der Verdacht, dass diese Tiere stille, nicht ausscheidende Träger oder intermittierende Ausscheider waren.

Dies konnte jedoch durch die qualitative bakteriologischen Kotuntersuchung widerlegt werden, da alle Tiere der drei Infektionsgruppen den jeweiligen Challengestamm zu allen Zeitpunkten des Experiments ausschieden, was sicherlich mit dem kurzen Beobachtungszeitraum zusammenhängt.

Die quantitative Ausscheidung war bei der *S. Infantis*-Gruppe immer signifikant am höchsten und bei der *S. Derby*-Gruppe immer signifikant am geringsten ausgeprägt. Dies korreliert weitestgehend mit den Ergebnissen der Klinischen Untersuchung, bei der die *S. Infantis*-Gruppe die deutlichsten Symptome einer Salmonellose offenbarte, während die *S. Derby*-Gruppe klinisch eher unauffällig war. Die Ausscheidung der Salmonellen mit den Faeces ist zum einen von der Infektionsdosis und zum anderen von ihrer Adhäsionsfähigkeit im Intestinaltrakt abhängig. Eine kurzzeitige Erregerhaftung im Darm führt zu einer intermittierenden Ausscheidung und wird unter Feldbedingungen durch Aufnahme niedriger Keimzahlen ( $10^3$  -  $10^5$ ) hervorgerufen (DEDIE et al. 1993). Die in den Infektionsversuchen gewählten Challengedosen waren mit  $1 \times 10^{10}$  KBE hingegen so hoch gewählt, dass es bei

keinem Tier zu einer intermittierenden Ausscheidung kam. Jedoch fiel die Zahl der mit den Faeces ausgeschiedenen Salmonellen bei allen drei Infektionsgruppen im Laufe des Experiments linear ab, wobei die signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen jedoch stets erhalten blieben. Im weiteren Verlauf war bei der *S. Derby*-Gruppe nach dem 4. Tag und bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe nach dem 6. Tag *post infectionem* kein quantitativer Nachweis von Salmonellen aus den Faeces mehr möglich, während bei der *S. Infantis*-Gruppe bis zum Ende des Experimentes hohe Salmonellenzahlen ausgeschieden wurden.

Die Untersuchungen zur Invasivität und Kolonisierungsrate jedes Challengestammes wurde anhand von 13, zum Teil für den menschlichen Verzehr bestimmten Organproben, welche mittels bakteriologischer Diagnostik in Anlehnung an die ISO 6579:2002 auf die Organbesiedlung von *Salmonella* überprüft wurden, durchgeführt.

Auf Grund ihrer Fähigkeit, in Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren, gelangen Salmonellen über den lymphatischen Weg in den Organismus des Wirts, wo sie unterschiedliche Organe kolonisieren und dort persistieren können (ALTHOUSE et al. 2003). In einer Studie mit experimentell infizierten Schweinen mit *S. Typhimurium* DT104 konnten MARG et al. (2001) die höchste Nachweisrate von Salmonellen in den Lnn. ileocaecales feststellen. Bei 5 Tage alten gnotobiotischen Ferkeln gelang es FOSTER et al. (2003) 48 Stunden nach einer experimentellen Infektion von Schweinen mit *S. Typhimurium*, Salmonellen aus Blut, Nieren, Leber, Magen, Duodenum und Ileum sowie aus dem Zäkum und den Ileozäkal-Lymphknoten zu isolieren, wobei die höchsten Nachweisraten aus Organproben des Verdauungstraktes erzielt werden konnten. Nach intranasaler Infektion mit *S. Infantis*, *S. Typhimurium* DT104 und *S. Derby* bei 14 Tage alten Ferkeln konnten LOYNACHAN et al. (2003) Salmonellen sowohl in intestinalen (Tonsille, Colon- und Caecuminhalt) als auch in extraintestinalen (Mandibular-Lymphknoten, Thymus, Lunge, Leber, Milz und Ileozäkal-Lymphknoten) Geweben nach Anreicherung nachweisen.

Die Kolonisation von intra- und extraintestinalen Geweben war im Rahmen der eigenen Untersuchungen ebenfalls nachweisbar. Außer der Milz, welche von der *S. Infantis*-Gruppe in keinem Fall besiedelt wurde, konnten die Challengestämme in allen anderen untersuchten Organproben isoliert werden. Lediglich die Häufigkeit der Besiedelung war von Serovar zu Serovar unterschiedlich. So betrug die Nachweisrate des jeweiligen Infektionsstammes bei den einzelnen Gruppen in Tonsille, Caecum, Colon, Mandibular-Lymphknoten, Jejunal-Lymphknoten und Ileozäkal-Lymphknoten bei allen Versuchstieren 100 %. Mit absteigender

Häufigkeit folgten die Organproben aus Ileum, Colon-Lymphknoten und Jejunum. Die extraintestinalen Gewebe Leber, Galle, Milz und Muskulatur wurden von allen drei Serovaren am seltensten kolonisiert. Jedoch ist zu bemerken, dass es bei den zum menschlichen Verzehr bestimmten Organen Leber und Muskulatur signifikante Unterschiede zwischen den drei Infektionsgruppen gab. So war einzig und allein bei der *S. Infantis*-Gruppe ein quantitativer Nachweis des Infektionsstammes in der Leber und in der Muskulatur möglich. Auch in der Gallenflüssigkeit erreichte der *S. Infantis*-Infektionsstamm einen signifikant höheren quantitativen Nachweis als bei den anderen beiden Stämmen.

Insgesamt betrachtet war die Besiedlungsrate von *S. Derby* mit 80,7 % am höchsten, unterschied sich aber gegenüber der Rate von *S. Typhimurium* DT104 mit 80,3 % nur unwesentlich. *S. Infantis* wurde mit einer Nachweisrate von 73,6 % am seltensten isoliert.

Die Kolonisationsraten stellen damit einen Widerspruch zu den Befunden der Klinischen Untersuchung dar, da die *S. Derby*-Gruppe und die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe kaum klinische Anzeichen einer Salmonellose ausbildeten, wohl aber die höchsten Kolonisationsraten aufweisen. Damit ist davon auszugehen, dass diese Serovaren ein erhöhtes Potential aufweisen, klinisch inapparente Salmonelleninfektionen auszulösen, und stellen somit ein erhöhtes Risiko für den Verbraucher dar.

Jedoch sollten die ermittelten Kolonisationsraten insofern kritisch betrachtet werden, da zwischen Infektion und Schlachtung nur ein sehr enges Zeitfenster besteht. Ein über einen Zeitraum von drei Wochen andauernden Versuch an experimentell mit *S. Typhimurium* DT104 infizierten Schweinen offenbarte mit 68,3 % schon eine deutlich geringere Gesamtbesiedlungsrate als bei den eigenen Untersuchungen (BRUMME et al. 2007). Hierbei kam es insbesondere in den Organen Leber und Milz zu einer deutlichen Reduktion der Salmonellenbelastung. Langzeitversuche an Schweinen mit identischen Infektionsstämmen und identischem Infektionsmodell erbrachten nach 17 bzw. 19 Wochen lediglich noch Gesamtbesiedlungsraten von 40,4 % für *S. Infantis* und 29,1 % für *S. Derby*, wobei in allen untersuchten Organen eine Reduktion der Salmonellenbelastung stattfand.

### 5.3 Serologische Untersuchung

Zur Charakterisierung der durch die verschiedenen *Salmonella*-Serovare induzierten humoralen Immunantwort erfolgte die Bestimmung der Serum-Antikörperaktivitäten der Isotypen IgA, IgG und IgM im Verlauf der Salmonelleninfektion. Dabei kam ein isotypspezifischer, indirekter ELISA nach RÖSLER (2007) zum Einsatz. Dieser Test beruht auf der sogenannten „Referenzstandard-Methode“, welche bei jedem Einzeltier konkrete Aussagen über die Dynamik der Immunantwort nach der Infektion ermöglicht. Die humorale Immunantwort im Verlauf einer Salmonelleninfektion setzt zeitlich verzögert ein und gestaltet sich zudem stark individuell. Die Zeit, welche die Ferkel zur Serokonversion benötigen, geben NIELSEN et al. (1995) mit einer Zeitspanne zwischen 6 und 36 Tagen an.

Generell gilt die Antikörperantwort verglichen mit der CD4-T-Zellantwort bei der Begrenzung der Salmonelleninfektion als weniger bedeutend, jedoch erscheint sie für den Schutz bei einer erneuten Infektion wichtig (MITTRUCKER et al. 2000). Systemische Antikörper dienen zudem zur Beseitigung der Salmonellen aus dem Blut und führen zu einer gesteigerten Phagozytose (MASTROENI et al. 2001).

IgM wird im Verlauf einer bakteriellen Infektion als erste Immunglobulinklasse gebildet und dient somit als Marker für frische Infektionen. Es weist zwar eine geringe Antigenbindungsstärke (Affinität) auf, jedoch ist durch die pentamere Struktur des IgM-Moleküls die Avidität stark erhöht (MADIGAN 2000). Diese befähigt IgM, außerdem als starker Aktivator der Komplementkaskade zu wirken.

Alle drei Challengestämme führten bei den Versuchstieren zu einem Anstieg der Antikörperaktivität dieses Isotyps. Dabei traten zwischen den drei Infektionsgruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Höhe der Antikörperaktivität auf, wobei die jeweiligen Maxima zwischen dem 7. und 13. Tag *post infectionem* erreicht wurden. Die höchsten spezifischen IgM-Aktivitäten wurden bei der *S. Derby* Gruppe gemessen. Dies steht höchstwahrscheinlich mit der hohen Kolonisationsrate und der damit verbundenen starken Stimulation der systemischen Immunantwort in Zusammenhang. Bemerkenswert war die anhaltend hohe IgM-Aktivität bis zum Ende des Experiments. Dies ist dadurch erklärbar, dass sich die Versuchstiere über den fäkal-oralen Infektionsweg fortlaufend neu mit dem Challengestamm infiziert haben und es dadurch zu einer ständigen Stimulierung von Lymphozyten des GALT (Gut Associated Lymphatic Tissue) und der damit verbundenen

humoralen Immunantwort gekommen ist. Bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe war die IgM-Aktivität insgesamt am niedrigsten ausgeprägt.

IgA gilt als wichtigstes Immunglobulin auf den Schleimhäuten des Gastrointestinal- und Respirationstrakts. Es kommt dort mit einer sekretorischen Komponente verbunden als Dimer vor und hat vor allem eine Bedeutung als neutralisierender Antikörper, der die systemische Verbreitung eines Infektionserregers verhindern soll. Im Blutserum vorkommendes monomeres IgA steht beim Schwein vermutlich mit einer Bakteriämie im Zusammenhang. Es ist jedoch als gesichert zu betrachten, dass es sich bei dem systemisch vorkommenden IgA um einen Metaboliten des auf den Schleimhäuten vorkommenden sekretorischen IgA handelt. Es besteht der Verdacht, dass die Menge an zirkulierendem IgA mit dem sekretorischen IgA der Schleimhäute korreliert (ISLAM et al. 1995; LILLARD et al. 2003).

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen lagen die spezifischen IgA-Antikörperaktivitäten aller drei Infektionsgruppen stets unterhalb der Nachweisgrenze.

Immunglobulin G, das als Monomer mit zwei hochaffinen Antigenbindungsstellen vorkommt, wird nach Antigenkontakt mit einer zeitlichen Verzögerung von 1-3 Wochen gebildet und hat eine große Bedeutung für die sekundäre Immunantwort (MADIGAN 2000). Die eigenen Untersuchungen ergaben bei allen drei Infektionsgruppen eine Steigerung der spezifischen IgG-Antikörperaktivität nach dem Challenge bis zum 16. bis 19. Tag *post infectionem*. Die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe wies dabei stets die höchste IgG-Aktivität auf. Dies ist vermutlich auf die hohe Kolonisationsrate insbesondere in den lymphatischen Organen zurückzuführen, die eine ständige Stimulation der B-Lymphozyten und somit der Immunglobulinproduktion nach sich zog.

Bei parallel durchgeführten Langzeit-Infektionsversuchen an Schweinen mit denselben Infektionsstämmen und gleichem Infektionsmodell wurden ebenfalls nur geringe IgA-Serumaktivitäten gemessen, welche bei Infektionen mit *S. Typhimurium* DT104 und *S. Derby* erst 19 Tage, bei der *S. Infantis* Infektion sogar erst 81 Tage nach dem Challenge anstiegen (SZABO et al. 2008).

Bei der *S. Typhimurium* DT104-Infektion wurde ebenfalls für IgG die höchste Serumaktivitäten festgestellt, allerdings erst im letzten Drittel des Experimentes. Dies macht die Bedeutung der spezifischen IgG-Serumaktivität zur Detektion chronischer Salmonelleninfektionen mit *S. Typhimurium* DT104 deutlich. Die spezifischen Serumaktivitäten für IgM waren über den gesamten Zeitraum des Experimentes analog zu den eigenen Untersuchungen auf einem geringen Niveau.

Bei den Infektionen mit *S. Infantis* und mit *S. Derby* waren die spezifischen Serumaktivitäten für IgG verglichen mit denen der *S. Typhimurium* DT104-Infektion insgesamt sehr niedrig. Eine Erhöhung der Aktivität fand erst in der zweiten Hälfte des Experimentes statt. Bemerkenswert war jedoch eine hohe IgM-Serumaktivität sowohl bei der *S. Derby*-Infektion als auch bei der *S. Infantis*-Infektion.

Diese serologischen Ergebnisse stimmen also weitgehend mit den eigenen Untersuchungen überein, obwohl das in dieser Arbeit untersuchte Zeitfenster von 4 Wochen dem der Langzeit-Infektionsversuche mit einem Zeitraum von 19 bzw. 20 Wochen gegenüber steht.

Somit gibt es in dieser Arbeit Hinweise, dass die Serologie besonders zur Detektion einer *S. Typhimurium*-Infektion geeignet ist, wobei IgG am sensitivsten zu reagieren scheint. Für die Erkennung einer bestehenden *S. Infantis*- oder *S. Derby*-Infektion beim Schwein ist die Serologie jedoch eher ungeeignet, da die spezifischen Antikörperaktivitäten nur moderat und erst relativ spät ansteigen. Dies stellt ein Problem für die „Schweine-Salmonellenverordnung“ dar, da die Kategorisierung ausschließlich anhand der serologischen Ergebnisse erfolgt

#### 5.4 Vergleich der Differentialblutbilder

Hinsichtlich des Differentialblutbildes konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den drei Infektionsgruppen aufgezeigt werden. Dabei waren insbesondere die *S. Infantis*-Gruppe und die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe mit starken Abweichungen vom Referenzbereich gekennzeichnet.

Das Differentialblutbild hat nach bakteriellen Infektionen und toxischen Schädigungen in der Regel immer einen dreiphasigen Verlauf (SCHILLING 1933; KRAFT et al. 2005). In der ersten Phase, welche als neutrophile Kampfphase bezeichnet wird, kommt es direkt nach anfänglicher Leukozytendepression zu einer Neutrophilie mit Linksverschiebung und relativer Lymphozyto- bis Monozytopenie. Danach schließt sich die monozytäre Abwehr- oder Überwindungsphase mit Monozytose an. Den Abschluss bildet die lymphozytär-eosinophile Heilphase mit Lymphozytose, Eosinophilie und Rückgang der Neutrophilen in den Normbereich.

### 5.4.1 Gesamtleukozytenzahl

Die Gesamtleukozytenzahlen stiegen bei allen drei Infektionsgruppen nach dem Challenge stetig an und es lag zum Ende des Experiments bei fast allen Tieren eine Leukozytose vor. Der initiale hohe Gesamtleukozytenspiegel bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe ist mit hoher Wahrscheinlichkeit stressbedingt auf den Transport dieser Tiere vom Erzeugerbetrieb zum Versuchstierstall kurz vor dem Challenge zurückzuführen, wodurch die Diskussion des weiteren Verlaufs kritisch zu betrachten ist. Jedoch gab es am Tag nach dem Challenge keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsgruppen, so dass eine weitere Interpretation der Blutbilder ab diesem Tag dennoch ermöglicht wird. Der Anstieg der Gesamtleukozyten ist als Reaktion auf den Challenge und der damit verbundenen Stimulation des Immunsystems zu verstehen. Hierbei erreichte ab Tag 5 des Experiments die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe die signifikant höchsten Gesamtleukozytenzahlen. Somit kann angenommen werden, dass die zelluläre Immunantwort bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe stärker stimuliert wurde als bei den anderen zwei Gruppen.

### 5.4.2 Neutrophile Granulozyten

Bei Betrachtung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten fällt der kurze, rasche Anstieg bei der *S. Infantis*-Gruppe auf, währenddessen es bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe nur zu einer vergleichsweise langsamen Erhöhung kommt. Die *S. Derby*-Gruppe gleicht in ihrem Verhalten der *S. Infantis*-Gruppe, wenngleich die Linksverschiebung bei weitem nicht so stark ausgeprägt ist. Der schnelle Anstieg bei der *S. Infantis*-Gruppe ist höchstwahrscheinlich auf einen hohen Verbrauch von segmentkernigen neutrophilen Granulozyten als Träger der unspezifischen zellvermittelten Abwehr in den entzündeten Abschnitten des Gastrointestinaltrakts innerhalb der neutrophilen Kampfphase zurückzuführen. Als Reaktion darauf werden die noch nicht vollständig ausdifferenzierten stabkernigen neutrophilen Granulozyten ins Blut ausgeschüttet, was bei akuten bakteriellen Infektionen typisch ist (KRAFT et al. 2005). Insgesamt kam es bei der *S. Infantis*-Gruppe zur stärksten, bei der *S. Derby*-Gruppe zur schwächsten Linksverschiebung.

### 5.4.3 Lymphozyten

Bei den Lymphozytenzahlen gab es schon vor dem Challenge signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsgruppen. Die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe wies vor dem Challenge eine Lymphozytopenie auf und war signifikant niedriger als bei den anderen zwei Infektionsgruppen, welche ihrerseits eine Lymphozytose zeigten. Diese ist jedoch als kritisch anzusehen, da es in der Literatur unterschiedliche Angaben zum Referenzbereich der Lymphozyten beim Schwein gibt. Die stark signifikante Lymphozytopenie der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe vor dem Challenge ist mit hoher Wahrscheinlichkeit als Reaktion auf den Transportstress zu verstehen, und macht eine weitere Interpretation der Lymphozytenzahlen dieser Gruppe nicht mehr möglich. Bei den anderen beiden Infektionsgruppen kam es nach dem Challenge zu einem starken Rückgang der Lymphozytenzahlen, die bei der *S. Infantis*-Gruppe signifikant am niedrigsten lag. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den starken Anstieg der stabkernigen, neutrophilen Granulozyten in der neutrophilen Kampfphase und der damit verbundenen Verschiebung im Differentialblutbild zu interpretieren. Im weiteren Verlauf kam es sowohl bei der *S. Infantis*-Gruppe als auch bei der *S. Derby*-Gruppe zu einem Anstieg der Lymphozytenzahl, die als Steigerung der zellulären Immunantwort zu verstehen ist.

### 5.4.4 Monozyten

Die Monozytenzahlen ergaben vor allem bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe signifikante Unterschiede gegenüber den anderen Infektionsgruppen. So reagierte die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe ab dem 3. Tag *post infectionem* mit einer deutlichen Monozytose, die bis zum Ende des Experimentes anhielt und signifikant höher war, als bei der *S. Infantis*-Gruppe und der *S. Derby*-Gruppe, bei denen die Monozytenzahl bereits drei Tage nach der Infektion wieder absank. Die Monozyten, als Teil der unspezifischen zellulären Immunantwort, kennzeichnen nach der biologischen Leukozytenkurve die Überwindung von akuten Infektionskrankheiten. Somit scheint die Überwindung der Infektion sowohl bei der *S. Infantis*-Gruppe als auch bei der *S. Derby*-Gruppe eher zu erfolgen als bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe, was auch weitestgehend mit den Befunden der klinischen Untersuchung korreliert, wonach die klinischen Symptome wie Körpertemperatur und

Allgemeinbefinden bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe länger anhielten als bei den anderen beiden Infektionsgruppen.

Insgesamt betrachtet kam es nach dem Challenge bei allen drei Infektionsgruppen zu einer leichten Leukozytose mit Linksverschiebung, Lymphopenie sowie einer Monozytose. Dabei kam es bei der *S. Infantis*-Gruppe und bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe zu den deutlichsten Abweichungen vom Referenzbereich, wohingegen die *S. Derby*-Gruppe kaum Abweichungen vom Referenzbereich offenbahrte.

## 5.5 Blutchemie

Beim Vergleich der drei Serumelektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid ergaben sich nur im Natrium- und Chloridgehalt signifikante Unterschiede und nur die *S. Infantis*-Gruppe und die *S. Typhimurium* DT104-Gruppe lagen dabei unterhalb des Referenzbereichs.

### 5.5.1 Natriumgehalt

Der Natriumgehalt im Blutserum sank sowohl bei der *S. Infantis*-Gruppe als auch bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe nach dem Challenge kontinuierlich bis zum 3. bzw 5. Tag *post infectionem* ab und kehrte danach allmählich in den Referenzbereich zurück. Dabei offenbarte die *S. Infantis*-Gruppe am 3. Tag den signifikant niedrigsten Natriumgehalt aller drei Infektionsgruppen. Dies korreliert mit der stärksten Durchfallsymptomatik der *S. Infantis*-Gruppe an diesem Tag des Experiments und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgrund der Enterotoxin-bedingten Aktivierung von Chloridkanälen und folgendem Ausstrom von Chlorid, welchem Natrium passiv folgt, assoziiert. Folglich ist es bei der *S. Infantis*-Gruppe zur signifikant stärksten Enterotoxinwirkung gekommen.

### 5.5.2 Chloridgehalt

Der Chloridgehalt im Blutserum sank bei der *S. Infantis*-Gruppe nach dem Challenge bis zum 3. Tag *post infectionem* ab und stieg gegen Ende des Experiments allmählich wieder bis in den Referenzbereich an. Bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe hingegen sank der Chloridgehalt nach dem Challenge bis zur Euthanasie kontinuierlich ab. Die Senkung des

Chloridgehaltes ist zum einen als Folge der Enterotoxinwirkung mit der damit verbundenen Aktivierung von Chloridkanälen zu interpretieren. Zum anderen scheint auch die Rückresorption von Chlorid im Ileum gestört zu sein, was eine Ursache für den kontinuierlichen Abfall des Chloridgehaltes bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe sein könnte und wahrscheinlich eine Folge von Schädigungen der Mukosa, ausgelöst durch *S. Typhimurium* DT104, ist (KRAFT u. WIRTH 2005).

Die blutchemische Untersuchung der drei Hauptelektrolyte als Durchfallparameter offenbarte sowohl bei der *S. Infantis*-Gruppe als auch bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe nach dem Challenge einen deutlichen Abfall der Natrium- und Chloridkonzentrationen im Blutplasma. Diese sind höchstwahrscheinlich auf Enterotoxine zurückzuführen bzw. auf Störungen der Rückresorption von Chlorid. Bei der *S. Derby*-Gruppe blieben nahezu alle Werte im Referenzbereich.

## 5.6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit ist die erste systematische und vergleichende Untersuchung der Infektionskinetik von *S. Infantis*, *S. Typhimurium* DT104 und *S. Derby* im Schwein mit natürlicher Infektionsroute. In dieser Arbeit wurde deutlich, dass *S. Infantis* auch beim Schwein schwere klinische Verläufe verursachen kann und in fleischhygienisch wichtigen Organen kolonisiert. Diese invasiven Isolate stellen jedoch neben den wirtschaftlichen Verlusten in der Fleischproduktion ein großes Problem für den Verbraucher dar, da es beim Menschen ebenfalls zu schweren Salmonellosen kommen kann. Auch wenn *S. Infantis* beim Schwein nicht so häufig isoliert wird wie zum Beispiel *S. Typhimurium* DT104, so sollte in Zukunft auf diese Serovar besonders Augenmerk gelegt werden. Für *S. Derby* wurde trotz schwacher Virulenz ein sehr hohes Kolonisationspotential nachgewiesen.

Diese Arbeit deutet darauf hin, dass *S. Infantis* und *S. Derby* für den Menschen ebenso bedeutsam sind wie *S. Typhimurium* und ein entsprechendes Monitoring erfordern.

## 6 Zusammenfassung

Martin Leffler

Vergleichende Charakterisierung der Salmonelleninfektion des Schweins mit den *Salmonella enterica*-Serovaren Typhimurium, Derby und Infantis

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2008

64 Seiten, 20 Abbildungen, 3 Tabellen, 109 Literaturstellen,

**Schlüsselwörter:** Schwein, *Salmonella*, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium, Infektion, Ausscheidung, Durchfall, ELISA

Ziel dieser Arbeit war es, die porcine Salmonelleninfektion unter Berücksichtigung der drei beim Schwein am häufigsten vorkommenden *Salmonella*-Serovaren anhand des klinischen Bildes, der quantitativen und qualitativen Erregerausscheidung, des Kolonisationsverhaltens, der Serokonversion bezüglich der unterschiedlichen Immunglobulin-Isotypen IgA, IgG und IgM sowie durch die Labordiagnostik näher zu charakterisieren. Bisherige Studien an Schweinen wurden überwiegend mit *S. Typhimurium* durchgeführt, weitere Serovare sind bisher nur unzureichend erforscht worden, obwohl sie ebenfalls zoonotisches Potential besitzen, aber vergleichsweise nur als gering virulent und kaum invasiv gelten.

Die Durchführung dieser Studie erfolgte mit 6 Wochen alten Absatzferkeln, welche nach einem bereits etablierten Modell mit den jeweiligen *Salmonella*-Serovaren infiziert wurden. Nach dem Challenge wurden die Tiere täglich klinisch untersucht und es wurden Kotproben zur qualitativen und quantitativen Erregerausscheidung entnommen. Parallel dazu wurden im Abstand von zwei bzw. drei Tagen Blutproben für ein Differentialblutbild, Blutchemie sowie für die serologische Untersuchung gewonnen. Nach einer Woche wurden die Tiere getötet und es wurden insgesamt 13 sterile Organproben gewonnen, um eine Aussage über das Kolonisationsverhalten treffen zu können.

Die Infektionsversuche zeigten, dass nach oraler Verabreichung von  $1 \times 10^{10}$  KbE die Tiere der mit *S. Infantis* infizierten Gruppe, entgegen den Erwartungen, die stärksten klinischen Symptome einer Salmonellose mit Diarrhoe, Fieber, Anorexie sowie reduziertem Allgemeinbefinden zeigten. Nach dem Challenge schieden alle Tiere der drei Infektionsgruppen den jeweiligen Challengestamm zu allen Zeitpunkten des Experimentes aus. Dabei war die quantitative Erregerausscheidung bei der *S. Infantis*-Infektionsgruppe stets am höchsten, bei der *S. Derby*-Gruppe stets am geringsten. Die Kolonisationsrate in den untersuchten Organproben war bei der *S. Derby*-Gruppe mit insgesamt 80,7 % am höchsten, gefolgt von der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe mit 80,3 %. *S. Infantis* wurde mit einer Kolonisationsrate von 73,6 % am seltensten isoliert. Bei der quantitativen bakteriologischen Untersuchung der Organproben wurden bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe die meisten Salmonellen vorwiegend aus den lymphatischen Organen isoliert, während bei der *S. Infantis*-Gruppe die Salmonellenbelastung in den essbaren Organen am höchsten war.

Die serologische Untersuchung mittels isotypspezifischen ELISA offenbarte für IgG einzig bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe einen deutlichen Anstieg der spezifischen Antikörperaktivität, während für IgM die höchste Aktivität bei der *S. Derby*-Gruppe gemessen wurde. Für IgA fand bei allen Tieren der drei Infektionsgruppen keine Serokonversion statt.

Im Differentialblutbild stellten sich bei allen Tieren der drei Infektionsgruppen nach dem Challenge mit einer Leukozytose, einer Linksverschiebung und einer Monozytose typische Anzeichen einer bakteriellen Infektion ein. Die blutchemische Untersuchung offenbarte besonders bei der *S. Typhimurium* DT104-Gruppe und der *S. Infantis*-Gruppe größere Verluste von Natrium und Chlorid nach dem Challenge, während es bei der *S. Derby*-Gruppe zu keinen Elektrolytverschiebungen im Plasma kam.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass *S. Infantis* auch beim Schwein schwere klinische Verläufe verursachen kann und auch in essbaren Organen kolonisiert. Diese invasiven Isolate stellen neben den wirtschaftlichen Verlusten ein großes Verbraucherschutzproblem dar. Obwohl die Prävalenz von *S. Infantis* beim Schwein nicht so hoch wie die von *S. Typhimurium* ist, so sollte diese Serovar in Zukunft besonders beobachtet werden. Für *S. Derby* wurde trotz schwacher Virulenz die höchste Kolonisationsrate nachgewiesen, was deren Potential, klinisch inapparente Salmonelleninfektionen auszulösen, deutlich macht.

Somit belegt diese Arbeit, dass *S. Infantis* und *S. Derby* für den Menschen sehr bedeutsam sein können und daher ein entsprechendes Monitoring erfordern.

## 7 Summary

Martin Leffler

Comparative characterization of the porcine *Salmonella*-infection with three different *Salmonella enterica*-Serotypes Typhimurium, Derby and Infantis

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine

University of Leipzig

Submitted in June 2008

64 pages, 20 figures, 3 tables, 109 references,

**Keywords:** Pig, *Salmonella*, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Typhimurium, infection, shedding, diarrhea, ELISA

The aim of the study was to characterise the porcine *Salmonella* infection with the three most common *Salmonella*-serotypes by means of clinical signs, quantitative and qualitative shedding rate, colonisation rate, specific antibody-response (IgA, IgG, IgM) in serum and laboratory diagnostics. Previous investigations were usually made with *Salmonella* Typhimurium, other serotypes have not been intensively investigated, although they also have zoonotic potential but comparatively they are considered as little virulent and hardly invasive. For this study twenty-two six-week-old hybrid pigs were infected with  $1 \times 10^{10}$  CFU of the respective serotype by an already established infection model. After the challenge the animals were examined daily concerning clinical signs and additionally faecal samples from each pig were collected in order to investigate the qualitative as well as the quantitative shedding rate. Every second and third day respectively blood samples were taken for subsequent determination of differential blood count, blood chemistry and serologic testing. After one week the animals were euthanized and thirteen sterile alimentary and non-alimentary tissues were collected for *Salmonella* isolation.

After oral administration of  $1 \times 10^{10}$  CFU the animals infected with *S. Infantis* showed contrary to expectations the strongest clinical symptoms of salmonellosis with diarrhea, fever, anorexia and reduced demeanour. The qualitative *Salmonella* shedding rate after the challenge was 100 % for all animals of the three groups at all points of time. Thereby the quantitative *Salmonella*

shedding rate of the *S. Infantis*-group was always the highest and of the *S. Derby*-group always the lowest. But the *S. Derby*-group achieved the highest colonization rate in the analysed tissues with a total of 80.7%, followed by the *S. Typhimurium* DT104-group with 80.3%. *S. Infantis* was isolated fewest with a rate of 73.6%. The quantitative bacteriological examination of the organs showed that *S. Typhimurium* DT104 was mainly isolated from lymphoid tissues, while *S. Infantis* was mainly isolated from edible organs.

Furthermore the results of specific serum antibody measurement showed differences between the three groups in the humoral immune response. For IgG only the *S. Typhimurium* DT104-group showed an increasing antibody activity while the *S. Derby*-group showed the significant highest antibody activity of IgM. There was no seroconversion of IgA in any animal.

In the differential blood count all animals of the three groups showed typical signs of a bacterial infection after the Challenge with a leukocytosis, a left shift and a monocytosis. The blood chemistry revealed that there was a greater loss of sodium and chloride especially in the *S. Typhimurium* DT104-group and the *S. Infantis*-group after the challenge, while the *S. Derby*-group showed no electrolyte shifts.

Summing up, this study shows that *S. Infantis* can also cause severe salmonellosis in pigs and particularly colonizes edible tissues. These invasive isolates are next to the economic losses a great problem for the consumer. Although the prevalence of *S. Infantis* in pigs is not as high as that of *S. Typhimurium* DT104, this serotype should be observed closely in the future. Despite weak virulence *S. Derby* achieved the highest colonization rate, which underlines its potential to cause clinically unapparent salmonella infections.

Hence, this study proves that *S. Infantis* and *S. Derby* can be very significant for the consumer and require an appropriate monitoring.

## 8 Literaturverzeichnis

Aabo S, Andersen JK, Olsen JE. Research Note - Detection of Salmonella in Minced Meat by the Polymerase Chain-Reaction Method. *Lett Appl Microbiol.* 1995; 21: 180-2.

Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. Salmonella Identification by the Polymerase Chain-Reaction. *Mol Cell Probes.* 1993;7: 171-8.

Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE. Type 1 fimbriae of Salmonella enterica serovar typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun.* 2003; 71: 6446-52.

Anderson RC, Nisbet DJ, Buckley SA, Genovese KJ, Harvey RB, Deloach JR, et al. Experimental and natural infection of early weaned pigs with Salmonella choleraesuis. *Res Vet Sci.* 1998; 64: 261-2.

Anonymus. Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Deutsches Institut für Normung, e.V. 1999; DIN 10135, Berlin.

Anonymus. Erkrankungen durch Lebensmittelverzehr in Deutschland 2005. *Epidemiologisches Bulletin* 41/2006.

Anonymus. Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine vom 13. März 2007. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2007.

Anonymus. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch 2007. Robert Koch Institut. 2008a.

Anonymus. Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Schlachtschweinen (Bericht des BfR vom 20.02.2008). Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin. 2008b.

Arnold T, Scholz HC, Marg H, Rösler U, Hensel A. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence, and survival of Salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. *J Vet Med B.* 2004; 51:459-63.

Bager F, Petersen J. Sensitivity and Specificity of Different Methods for the Isolation of Salmonella from Pigs. *Acta Vet Scand.* 1991; 32: 473-81.

Bauer J, Hörmannsdorfer S. Salmonellose bei Nutztieren. *Fleischwirtsch.* 1995; 75: 958-60.

Bäumler AJ, Hargis BM, Tsois, RM. Tracing the origins of Salmonella outbreaks. *Science.* 2000; 287: 50-2.

Bäumler AJ, Tsois RM, Heffron F. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93: 279-83.

Bisping W, Amtsberg G. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Berlin, Hamburg: Paul Parey; 1988.

- Blaaha T. Die Ausbreitungsdynamik von Salmonellen in Tierbeständen. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1993; 100: 278-80.
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. The Proteobacteria. In: Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> Edition. New York: Springer; 2005.
- Böhm R. Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1993; 100: 275-8.
- Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. Infection Immun. 1998; 66: 3372-7.
- Brumme S, Arnold T, Sigmarsson H, Lehmann J, Scholz HC, Hardt WD, et al. Impact of *Salmonella Typhimurium* DT104 virulence factors *invC* and *sseD* on the onset, clinical course, colonization patterns and immune response of porcine salmonellosis. Vet Microbiol. 2007; 124: 274-85.
- Bryan FL. Risk of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. J Food Prot. 1988; 51: 663-73.
- Butler JE, Feldbush TL, Mcgovern PL, Stewart N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) - Measure of Antibody Concentration Or Affinity. Immunochemistry. 1978; 15: 131-6.
- Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles CL, Thoen CO, (Hrsg.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ames: Iowa State University Press; 1993.
- Cote S, Letellier A, Lessard L, Quessy S. Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. Can J Vet Res. 2004; 68: 241-8.
- Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K-J, Weinke T. Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Stuttgart: Enke Verlag; 1993.
- De Ryck R, Struelens MJ, Serruys E. Rapid biochemical screening for *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, and *Aeromonas* isolates from stool specimens. J Clin Microbiol. 1994; 32: 1583-5.
- De Zutter L, De Smedt JM, Abrams R, Beckers H, Catteau M, De Borchgrave J, et al. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. Int J Food Microbiol. 1991; 13: 11-20.
- Edel W, Kampelmacher EH. Comparative Studies on *Salmonella*-Isolation in 8 European Laboratories. WHO Bull. 1968; 39: 487-91.
- Edel W, Kampelmacher EH. Comparative Studies on Isolation of Sublethally Injured *Salmonellae* in 9 European Laboratories. WHO Bull. 1973; 48: 167-74.
- Edel W, Kampelmacher EH. Comparative Studies on *Salmonella* Isolations from Feeds in 10 Laboratories. WHO Bull. 1974; 50: 421-6.
- Euzeby JP. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) *Le Minor* and *Popoff* 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name

- Salmonella choleraesuis (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name Salmonella typhi (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 927-30.
- Fedoraka-Cray PJ. Mechanism of host-agent interactions in subclinical Salmonella infection in pig herds. 2nd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, Copenhagen. 1997; 9-18.
- Fehlhaber K. Schwierigkeiten und Defizite in der Bekämpfung lebensmittelbedingter Salmonellosen. *Fleischwirtsch.* 2001; 81: 108-10.
- Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of Salmonella-Typhimurium That Cannot Survive Within the Macrophage Are Avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 5189-93.
- Finlay BB, Ruschkowski S, Dedhar S. Cytoskeletal Rearrangements Accompanying Salmonella Entry into Epithelial-Cells. *J Cell Sci.* 1991; 99 (2): 283-296.
- Foster N, Lovell MA, Marston KL, Hulme SD, Frost AJ, Bland P, et al. Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent Salmonella enterica. *Infect Immun.* 2003; 71: 2182-91.
- Funk JA, Harris IT, Davies PR. Comparison of fecal culture and Danish Mix-ELISA for determination of Salmonella enterica subsp. enterica prevalence in growing swine. *Vet Microbiol.* 2005; 107: 115-26.
- Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: homology of invA to members of a new protein family. *J Bacteriol.* 1992; 174: 4338-49.
- Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 1999; 284: 1322-8.
- Garcia del Portillo F, Finlay BB. Salmonella invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infect Immun.* 1994; 62: 4641-5.
- Gareis M. Salmonellen – ein Überblick. *Fleischwirtsch.* 1995; 75: 954-7.
- Hahn H, Falke D, Klein P. *Medizinische Mikrobiologie.* 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag; 1994: 314-23.
- Heinritzi K. Krankheiten des Verdauungstraktes. In: Heinritzi K, Gindele HR, Reiner G, Schnurrbusch U. *Schweinekrankheiten.* Stuttgart: Ulmer Verlag; 2006: 147-63.
- Hof H, Dörries R, Müller RL. *Mikrobiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2000.
- Islam D, Wretling B, Ryd M, Lindberg AA, Christensson B. Immunoglobulin Subclass Distribution and Dynamics of Shigella-Specific Antibody-Responses in Serum and Stool Samples in Shigellosis. *Infect Immun.* 1995; 63: 2054-61.

- Jones BD, Paterson HF, Hall A, Falkow S. Salmonella-Typhimurium Induces Membrane Ruffling by A Growth Factor-Receptor-Independent Mechanism. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 10390-4.
- Kauffmann F. Die Bakteriologie *der Salmonella*- Gruppe. Munksgaard: Kopenhagen; 1941.
- Kauffmann F. Das Salmonella subgenus IV. Ann Immunol Hungar. 1966; 9: 77-80
- Koch J, Alpers K, Ammon A. Infektionen mit Salmonellen beim Menschen. In: Hartung M. (Hrsg.): Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001. Übersicht über die Meldungen der Bundesländer. BgVV-Heft 6/2002; 2002: 19-22.
- Kraft W, Dürr UM, Fürll M, Bostedt H, Heinritzi K. Hämatologie. In: Kraft W, Dürr, UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2005: 49-92.
- Kraft W, und Wirth W. Elektrolyte und Säure-Basen- Haushalt. In: Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2005: 272-83.
- Kramer TT. Swine Salmonellosis: What is new about it? *Agri-Practice*. 1995; 16: 13-6.
- Krauss H, Weber A, Enders B, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner, H. Zoonosen, 3.Auflage. Köln: Deutscher Ärzte- Verlag; 2004.
- Le Minor L. Genus III. Salmonella. In: Krieg NR, Holt JG. Bergey's manual of systematic bacteriology, 1<sup>st</sup> Edition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984: 427-58.
- Le Minor L, Popoff MY, und Böckemühl J. Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol. 1990; 141: 1173-7.
- Lehmann J, Rösler U, Lindner T, Kramer T, Gabert J, Hensel A. Discrimination of vaccinated and infected pigs by Salmonella-specific IgA antibodies. Proceedings of the 5th International symposium on the Epidemiology and Control of food borne pathogens in Pork, 2003 in Heraklion (Griechenland); 2003: 90-1.
- Lehmann J, Lindner T, Naumann M, Kramer T, Steinbach G, Blaha T, et al. Application of a novel Pig Immunoglobulin-Isotype-specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Antibodies in Serum and Meat Juice. Proceedings of the 18. International Pig Veterinary Society World Congress, Hamburg 2004; Vol.1: 388.
- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, Guiney DG. The Salmonella virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. Cell Microbiol. 2000; 2: 49-58.
- Lillard JW, Jr Singh UP, Boyaka PN, Singh S, Taub DD, McGhee JR. MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. Blood. 2003; 101: 807-14.
- Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL. Acute infection of swine by various Salmonella serovars. J Food Prot. 2004; 67: 1484-8.

- Madigan MT. Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2001.
- Malorny B. persönliche Mitteilung; 2008.
- Marg H, Scholz HC, Arnold T, Roesler U, Hensel A. (2001): Influence of long-time transportation stress on re-activation of *Salmonella* Typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001; 114: 385-8.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *Vet J.* 2001; 161: 132-64.
- McGill RJ, Tukey JW, Larson WA. Variations of Box Plots. *Am Statist.* 1978; 32: 12-6.
- Methner U, Berndt A, Steinbach G. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. *Avian Dis.* 2001; 45: 631-8.
- Meyer H. Tiere als Infektionsquelle für den Menschen – Salmonellose. *Dtsch Tierarztl Wochenschrift.* 1999; 106: 344-51.
- Mittrucker HW, Kaufmann SHE. Immune response to infection with *Salmonella* typhimurium in mice. *J Leukoc Biol.* 2000; 67: 457-63.
- Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, et al. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 2004; 54: 994-1010.
- Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet Microbiol.* 1995; 47, 205-18.
- Nielsen B, Alban L, Stege H, Sorensen LL, Mogelmose V, Bagger J, et al. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001; 114: 323-6.
- Nielsen B. Pork safety—a world overview. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, Ames, USA; 2002: 121–35.*
- Nalua NA, Lindberg AA. *Salmonella-Choleraesuis* Strains Deficient in O-Antigen Remain Fully Virulent for Mice by Parenteral Inoculation But Are Avirulent by Oral-Administration. *Infect Immun.* 1990; 58: 2493-501.
- Olsen A, Aabo S, Nielsen EO, Nielsen BB. Isolation of a *Salmonella*-specific DNA hybridization probe. *APMIS.* 1991; 99: 114-20.
- Pietzsch O. *Salmonella*. In: Blobel H, Schliesser T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Jena: VEB Fischer Verlag; 1981.
- Popoff MY, Böckemühl J, McWhorter-Murlin A. Supplement 1993 (no. 37) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 1994; 145: 711-6.
- Popoff MY, Böckemühl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol.* 2004; 155: 568-70.

- Prasad R, Chopra AK, Chary P, Peterson JW. Expression and Characterization of the Cloned Salmonella-Typhimurium Enterotoxin. *Microb Pathogen*. 1992; 13: 109-21.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard, FC. Salmonella serotypes. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd., London; 2002: 113-8.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, et al. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes*. 1992; 6: 271-9.
- Rasch G, Schrader C. Infektionen mit Zoonoseerregern beim Menschen. In: Anon.: *Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Infektionen nach der Zoonose-RL (92/117/EWG) für 1997*; 1996: 5-9.
- Reed WM, Olander HJ, Thaker HL (1986): Studies on the pathogenesis of Salmonella Typhimurium and Salmonella Choleraesuis var.kunzendorf infection in weanling pigs. *Am J Vet Res*. 1986; 47: 75-83.
- Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ. Clonal Nature of Salmonella-Typhi and Its Genetic Relatedness to Other Salmonellae As Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Proposal of Salmonella-Bongori Comb Nov. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 313-20.
- Robbins JB, Chu CY, Schneerson R. Hypothesis for Vaccine Development - Protective Immunity to Enteric Diseases Caused by Nontyphoidal Salmonellae and Shigellae May be Conferred by Serum Igg Antibodies to the O-Specific Polysaccharide of Their Lipopolysaccharides. *Clin Infect Dis*. 1992; 15: 346-61.
- Roesler U, Marg H, Schroder I, Mauer S, Arnold T, Lehmann J, et al. Oral vaccination of pigs with an invasive gyrA-cpxA-rpoB Salmonella Typhimurium mutant. *Vaccine*. 2004; 23: 595-603.
- Roesler U, Von Altrock A, Heller P, Bremerich S, Arnold T, Lehmann J, et al. Effects of Fluorequinolone Treatment Acidified Feed, and Improved Hygiene Measures on the Occurrence of Salmonella Typhimurium DT104 in an Integrated Pig Breeding Herd. *J Vet Med B*. 2005; 52: 69-74.
- Roesler, U. Charakterisierung der porzinen Salmonella Typhimurium DT 104- Infektion und Maßnahmen zur Salmonellen- Reduktion in Schweinemast- und Zuchtbetrieben [ Habilschr. med.vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.
- Sander J. Die Pathogenese von Salmonelleninfektionen des Menschen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1993; 100: 283-5.
- Saxen H, Reima I, Makela PH. Alternative Complement Pathway Activation by Salmonella-O Polysaccharide as a Virulence Determinant in the Mouse. *Microb Pathogen*. 1987; 2: 15-28.
- Scherer K, Szabo I, Rösler U, Appel B, Hensel A, Nöckler K. Time course of infection with Salmonella typhimurium and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J Food Prot*. 2008; 71: 699-705.

- Schilling V. Das Blutbild und seine klinische Bedeutung, 10.Auflage Jena: Fischer Verlag; 1933.
- Schöll W. Zum Stand, zur Bedeutung und zur Bekämpfung von Salmonelleninfektionen bei Schweinen in der DDR. MonatshVeterinarmed. 1982; 37: 521-6.
- Schwartz KJ. Salmonellosis in Swine. Comp Contin Educ Pract Vet. 1991; 13: 139-43.
- Schwartz KJ. Salmonellosis. In: Straw P, Mengeling W, D`Allaire S, Taylor D. (Hrsg): Diseases of Swine. 8th Edition. Iowa State University Press; 1999: 535-51.
- Selbitz HJ, Sinell AM, Sziegoleit A. Das Salmonellen-Problem. Stuttgart: Verlag Gustav Fischer; 1995.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayer A.: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag; 2006: 417-588.
- Stege H, Carstensen B, Christensen J, Feld NC, Baggesen DL, Nielsen JP. Subclinical Salmonella infection in Danish finishing pig herds: Association between serological and bacteriological testing. Proc. of the 2nd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, Kopenhagen, Dänemark; 1997: 114-9.
- Steinbach G, Hartung M. An attempt to estimate the share of human cases of salmonellosis attributable to Salmonella originating from swine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr.1999;112: 296-300.
- Steinbach G, Staak C, Bahn P. Possibilities for standardisation of the ELISA for detection of Salmonella antibodies in sera and meat juices of pigs. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 2000; 113: 331-4.
- Szabo I, Scherer K, Rösler U, Appel B, Nöckler K, Hensel A. Comparative examination and validation of ELISA test systems for Salmonella typhimurium diagnosis of slaughtering pigs. In J Food Microbiol. 2008; 124: 65-9.
- Von Altrock A, Schutte A, Hildebrandt G. Results of the German Investigation in the EU-Project "Salmonella in Pork (Salinpork)" - Part 1: Investigations in the farms. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2000; 113: 191-201.
- Waldmann KH, Plonait H. Erkrankungen der Verdauungsorgane und des Abdomens. In: Waldmann KH, Wendt M.: Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Berlin: Parey Buchverlag; 2004: 307-84.
- Waltman WD, Mallinson ET. Isolation of Salmonella from Poultry Tissue and Environmental-Samples - A Nationwide Survey. Avian Dis. 1995; 39: 45-54.
- Waltmann WD. Methods for the cultural Isolation of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Hrsg.): Salmonella in domestic animals. New York : CABI Publishing; 2000: 355-72.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BH, Verhoef J. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of Salmonella. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991; 10: 935-8.

Wong YY, Ng SP, Ng MH, Si SH, Ya SZ, Fung YS. Immunosensor for the differentiation and detection of *Salmonella* species based on a quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron.* 2002; 17: 676-84.

Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of Persistent *Salmonella*-Typhimurium Infection in Internal Organs of Swine. *Am J Vet Res.* 1989; 50: 1015-21.

Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galan JE. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol.* 2001; 39: 248-59.

Zhou DG, Galan J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* 2001; 3: 1293-8.

