

Ein Schwein, das mit dem Wildstamm infiziert wurde, fraß weniger als vor der Infektion. Die Verminderung der Futteraufnahme begann am Tag 2 und hielt 2 Tage an. Erbrechen wurde bei einem Schwein zwischen den Tagen 2 und 3 beobachtet. Es war ein gehäuftes Erbrechen (Score 2) in diesem Zeitraum zu beobachten. Tiere der zwei Mutanten-Infektionsgruppen zeigten weder eine Verminderung der Nahrungsaufnahme noch Erbrechen.

Bei allen drei Infektionsgruppen war die Atmung während des Beobachtungszeitraums unbeeinträchtigt.

Detaillierte Daten der klinischen Untersuchung sind den Tabellen 9 und 10 im Anhang zu entnehmen.

Aus technischen Gründen konnten die Schweine der Gruppe „*sseD::aphT*“ am dritten Tag und die der Gruppen „*sseD::aphT*“ sowie „*invC::aphT*“ am 21 Tag nach der Infektion nicht gewogen werden, so dass entsprechende Körpergewichte fehlen. So wird das Körpergewicht vom Tag 17 nach der Infektion als Endgewicht genutzt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten (Tabelle 6).

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere der drei Versuchsgruppen unterschied sich am Tag der Infektion nicht signifikant. Alle Tiere nahmen bis zum Tag 16 post infectionem zu. Die Gewichtszunahme variierte jedoch im Vergleich zwischen den Gruppen. Sie war bei mit der Mutante *invC::aphT* infizierten Tieren größer als bei Tieren, die mit dem Wildstamm infiziert wurden, und zwar durchschnittlich 9 kg *versus* 6 kg; ($P \leq 0,05$). *sseD::aphT* infizierte Tiere nahmen ca. 7 kg zu (nicht signifikant im Vergleich aller Gruppen).

Tabelle 6. Körpergewichte (Mittelwert \pm s) der mit dem Wildtyp DT 104 und mit den Deletionsmutanten *invC::aphT* bzw. *sseD::aphT* infizierten Schweine in kg

Tag p.i.	WT DT 104 n = 8	DM- <i>invC::aphT</i> n = 9	DM- <i>sseD::aphT</i> n = 8
0	8,9 \pm 1,3 ^d	10,3 \pm 1,2 ^d	9,9 \pm 1,1 ^d
3	9,0 \pm 1,2 ^{B,d}	11,6 \pm 1,5 ^{A,c,d}	nicht verfügbar ¹
7	9,6 \pm 1,4 ^{B,d}	13,6 \pm 1,8 ^{A,b,c}	10,9 \pm 1,0 ^{B,c,d}
10	11,2 \pm 1,5 ^{B,c,d}	14,7 \pm 1,5 ^{A,b}	12,5 \pm 1,9 ^{B,b,c}
14	13,0 \pm 1,9 ^{B,b,c}	17,7 \pm 1,8 ^{A,a}	14,0 \pm 2,6 ^{B,b}
17	14,8 \pm 2,1 ^{B,a,b}	19,2 \pm 2,6 ^{A,a}	16,5 \pm 1,8 ^{A,B,a}
21	16,8 \pm 2,5 ^a	nicht verfügbar ¹	nicht verfügbar ¹
¹ Tiere konnten aus technischen Gründen nicht gewogen werden. p.i. = post infectionem. WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante (A, B) Werte unterscheiden sich signifikant in Zeilen (P \leq 0,05). (a–d) Werte unterscheiden sich signifikant in Spalten (P \leq 0,05).			

4.2 Hämatologische Befunde

Tiere aller drei Gruppen wiesen ein weißes Blutbild auf, welches sich im Anschluss an die Infektion veränderte. Dabei unterschieden sich die Gruppen in der Qualität der Veränderungen.

Nach Infektion mit dem Wildtyp stieg bei allen Schweinen die Gesamtleukozytenzahl bis zum Tag 10, um dann langsam bis zum Tag 21 wieder abzufallen, ohne das die Ausgangswerte erreicht werden konnten (P \leq 0,05; Abbildung 6). Auch bei Tieren, die mit der Mutante *sseD::aphT* infiziert wurden, kam es zu einem Anstieg der Gesamtleukozytenzahl. Dieser war allerdings kurz und nur auf den Tag 3 post infectionem beschränkt. Die Gesamtleukozytenzahl der Schweine, welche die Mutante *invC::aphT* erhielten, fluktuierte und wies am Tag 14 nach der Infektion maximale Werte auf, ohne das die Unterschiede statistisch signifikant waren.

Die Gesamtleukozytenzahl ist in Abbildung 8 zusätzlich grafisch als Boxplots dargestellt, um den Vergleich zwischen den Gruppen an den jeweiligen Beprobungstagen zu erleichtern. Die Gruppen unterschieden sich an einem oder mehreren der Beobachtungstage signifikant

voneinander ($P \leq 0,05$), ohne das ein klares, dem Infektionsstamm zuzuordnendes Muster zu erkennen war.

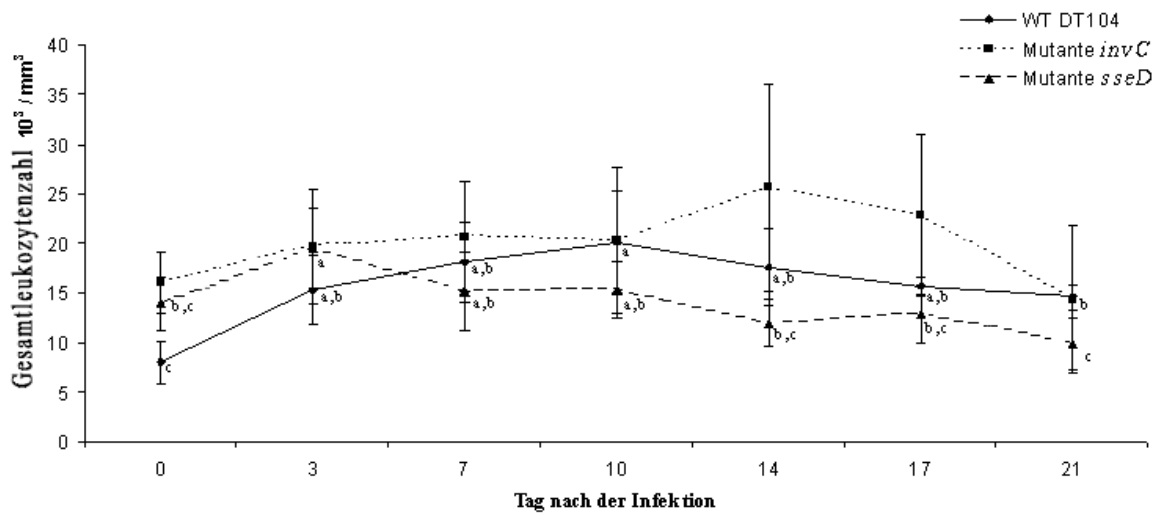


Abbildung 6. Gesamtleukozytenzahl (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*. (a–c) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

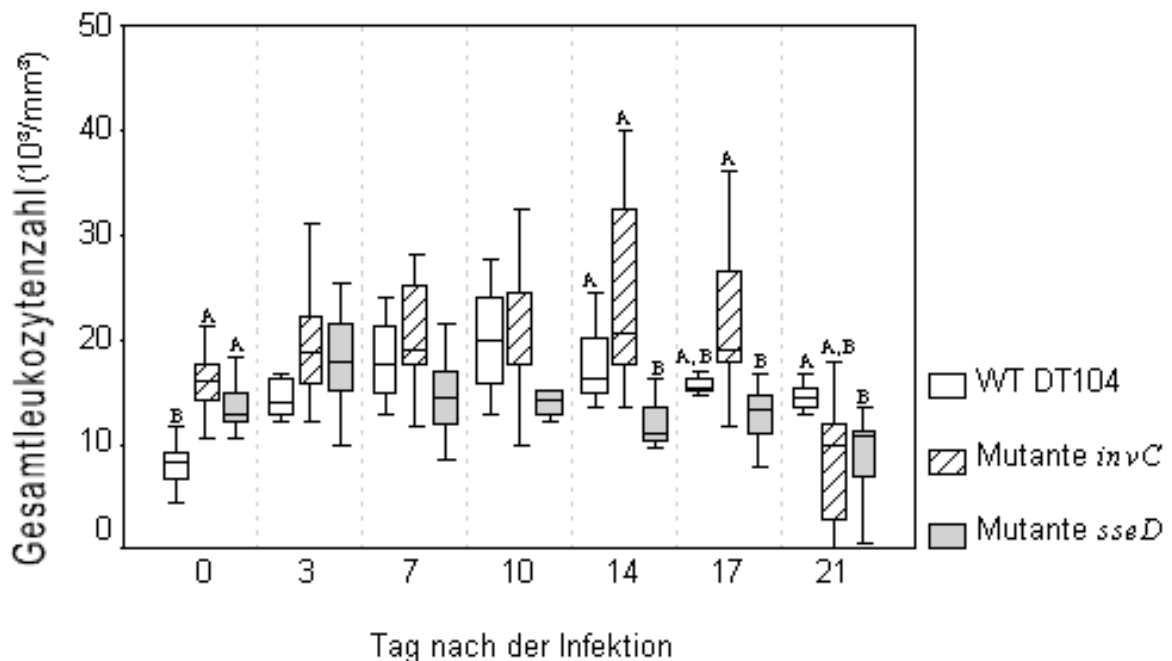


Abbildung 7. Gesamtleukozytenzahl (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A–C) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

Ähnlich zu Veränderungen in der Gesamtleukozytenzahl veränderten sich einzelne Zellpopulationen des Differentialblutbildes. Nach der Infektion sank der prozentuale Anteil der Lymphozyten bei den Tieren, die mit dem Wildtyp bzw. der Mutante *invC::aphT* infiziert wurden (Abbildung 8). Während sich *invC::aphT* infizierte Tiere davon schon am Tag 7 erholt hatten bzw. höhere Werte als zum Zeitpunkt vor der Infektion aufwiesen, fiel der Anteil der Lymphozyten der mit dem Wildstamm infizierten Tiere nochmals (wenn auch nicht signifikant), um auf diesem Level bis zum Ende des Beobachtungszeitraums zu verbleiben. Im Vergleich dazu blieb der prozentuale Anteil der Lymphozyten bei Tieren, die mit der Mutante *sseD::aphT* infiziert wurden, relativ konstant (Abbildung 8).

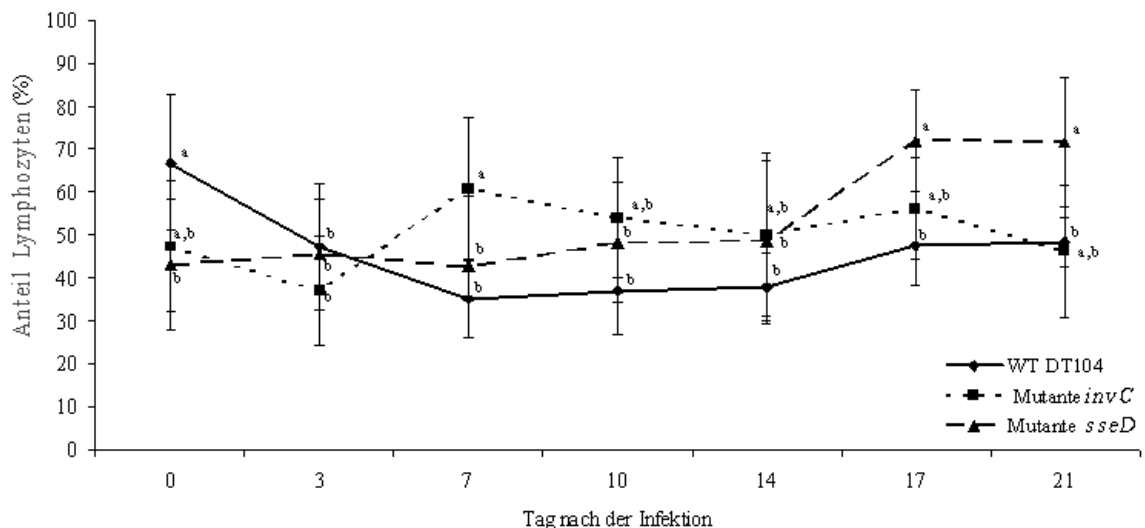


Abbildung 8. Prozentualer Anteil an Lymphozyten (Mittelwert \pm s) bei infizierten Schweinen. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*. (a–c) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

Zwischen den drei Gruppen gab es zum Teil erhebliche Unterschiede (Abbildung 9). So wiesen Tiere der mit dem Wildstamm infizierten Gruppe am Tag 0 (d.h. vor der Infektion) mehr Lymphozyten als Tiere auf, die Mutante *sseD::aphT* erhielten, während Letztere an den Tagen 17 und 21 post infectionem den höchsten Anteil hatten ($P \leq 0,05$). Tiere, die Mutante *invC::aphT* erhielten, dominierten dahingehend am Tag 7 nach der Infektion ($P \leq 0,05$).

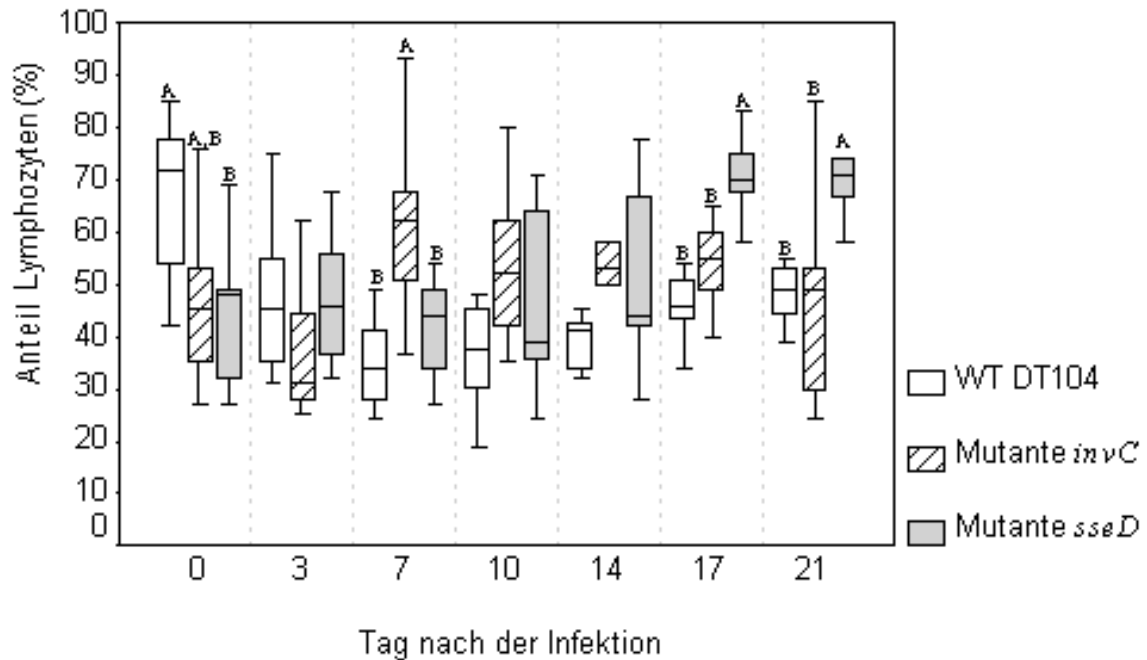


Abbildung 9. Prozentualer Anteil an Lymphozyten (Mittelwert \pm s) bei infizierten Schweinen. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A,B) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

Während die Tiere, die den Wildtyp erhielten, nach der Infektion mit einem deutlichen Anstieg des prozentualen Anteils mit neutrophilen Granulozyten (nachfolgend „Neutrophile“ genannt) reagierten, blieb eine derartige Reaktion bei mit Mutanten infizierten Tieren weitestgehend aus (ohne Abbildung).

Der Anstieg des Anteils neutrophiler Granulozyten mit dem Wildstamm infizierter Tiere war auf eine Zunahme des Anteils sowohl stab- wie auch segmentkernige Granulozyten zurückzuführen (Abbildungen 10 und 11). Bei Tieren, welche die *invC::aphT*-Mutante erhielten, blieb dieser Anteil jeweils relativ konstant. Im Vergleich dazu sank der Anteil an stab- wie auch segmentkernige Granulozyten *sseD::aphT*-Mutante infizierter Tiere sukzessive während des Beobachtungszeitraums ($P \leq 0,05$).

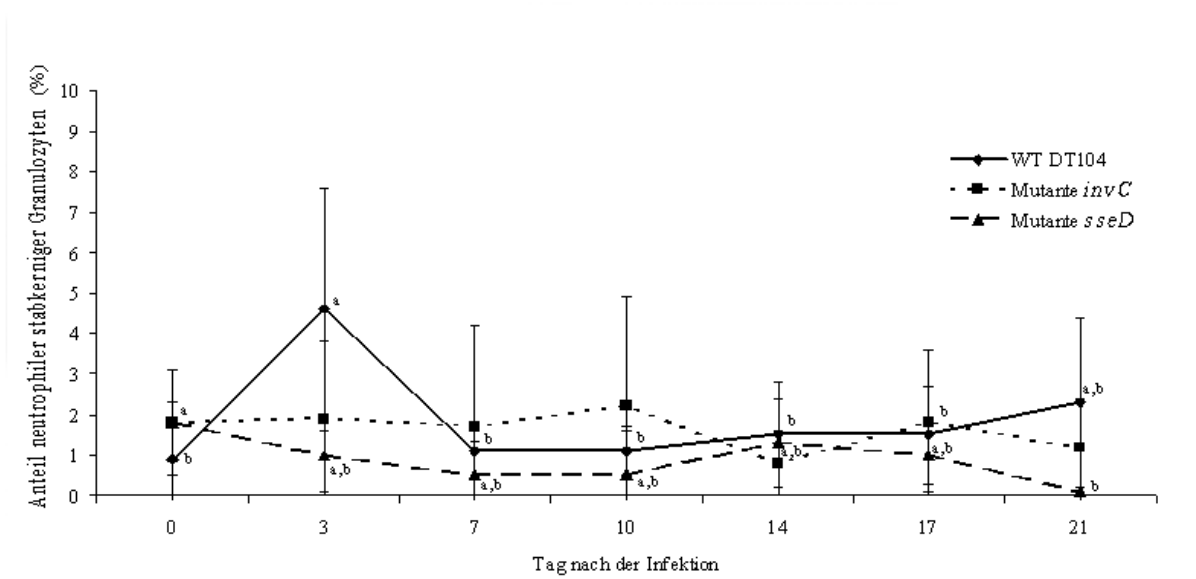


Abbildung 10. Prozentualer Anteil neutrophiler stabkerniger Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (a,b) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

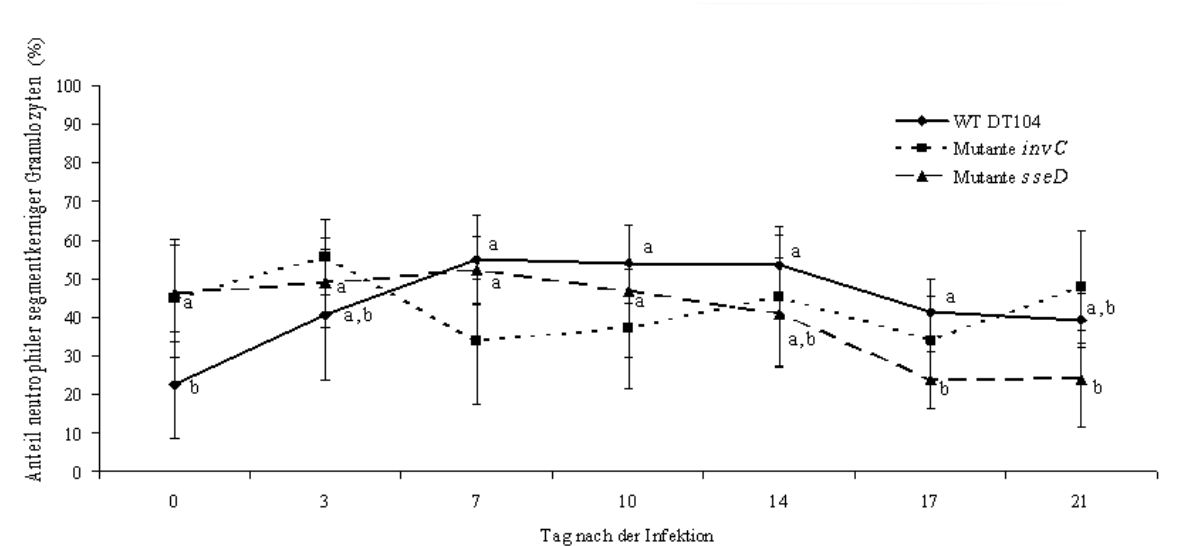


Abbildung 11. Prozentualer Anteil neutrophiler segmentkerniger Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (a,b) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

Im Gruppenvergleich für die jeweiligen Untersuchungstage fluktuieren die segmentkernigen wesentlich stärker als die stabkernigen Neutrophilen. Die Stabkernigen unterschieden sich lediglich am Tag 3 nach der Infektion; mit dem Wildstamm infizierte Tiere wiesen einen höheren Prozentsatz dieser Zellen auf als Tiere, die mit der Mutante *sseD::aphT* infiziert wurden ($P \leq 0,05$; Abbildung 12). Die Anzahl Segmentkerniger war mal bei der einen, mal bei der anderen Gruppe höher bzw. niedriger ($P \leq 0,05$; Abbildung 13). Ein klares Muster war nicht zu erkennen.

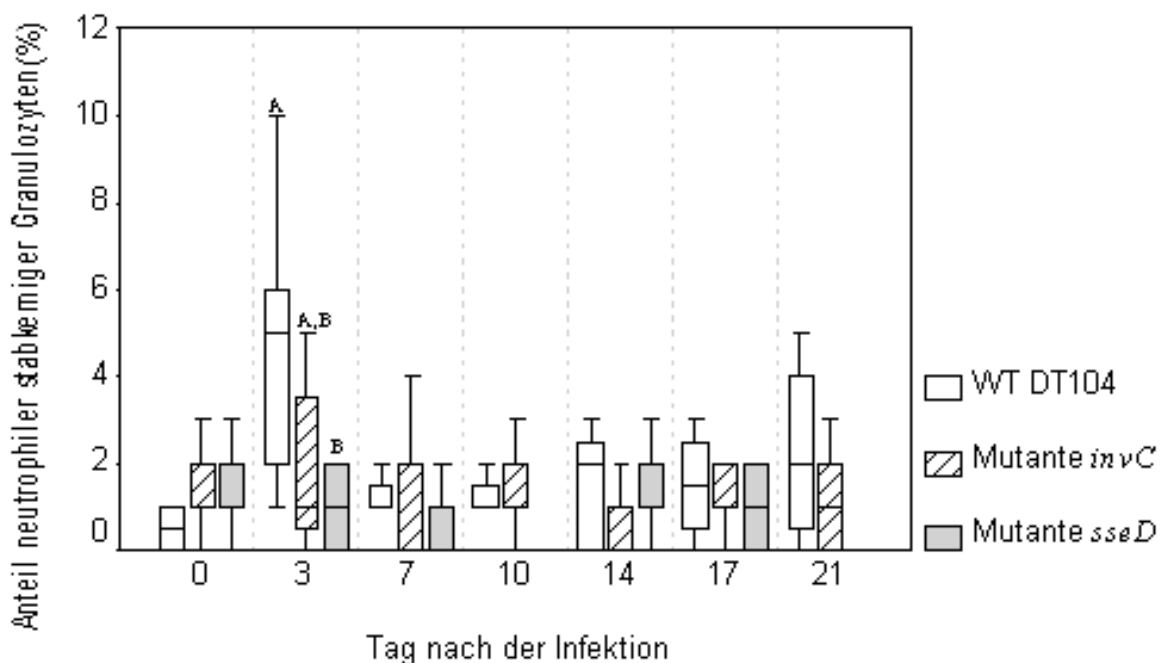


Abbildung 12. Prozentualer Anteil neutrophiler stabkerniger Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A,B) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

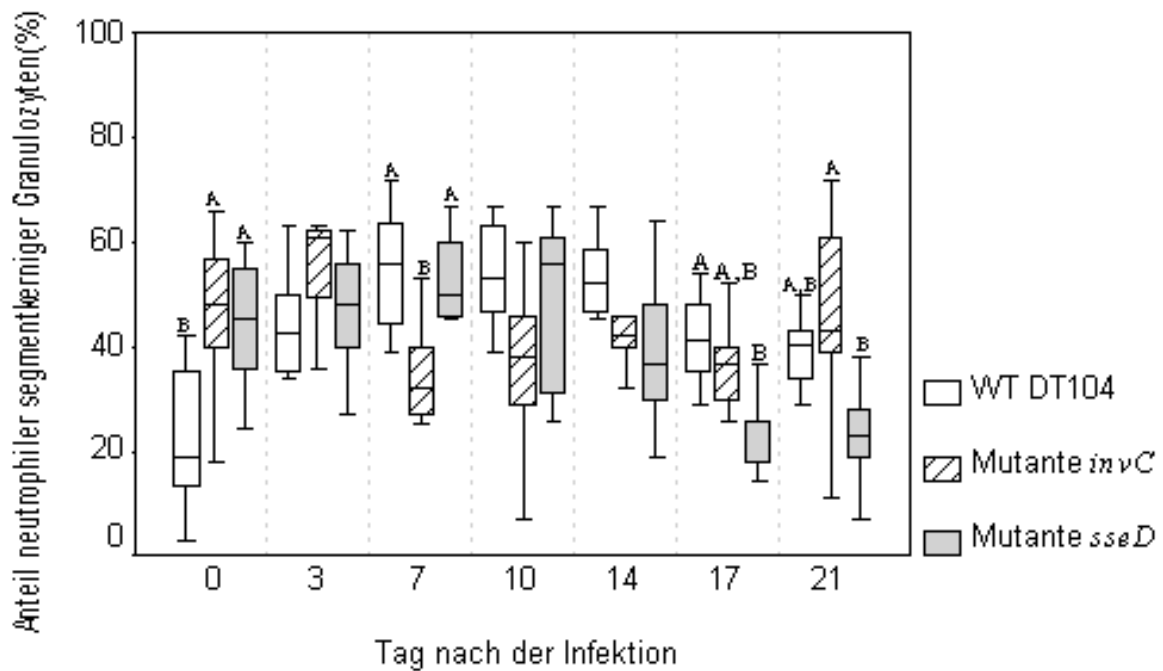


Abbildung 13. Prozentualer Anteil neutrophiler segmentkerniger Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A,B) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

Die relative Anzahl der eosinophilen Granulozyten zeigte bei allen Gruppen geringe Schwankungen. Die Gruppe der mit dem Wildstamm infizierten Tiere zeigte dabei die stärksten Fluktuationen, die scheinbar einer gewissen Regelmäßigkeit unterlagen (niedrig-hoch-niedrig; Abbildung 14). Unterschiede zwischen den Gruppen gab es an den Tagen 7, 14 und 17 nach der Infektion. Mit dem Wildstamm infizierte Tiere wiesen an diesen Tagen relativ mehr eosinophile Granulozyten als Tiere der Vergleichsgruppen auf (Abbildung 15).

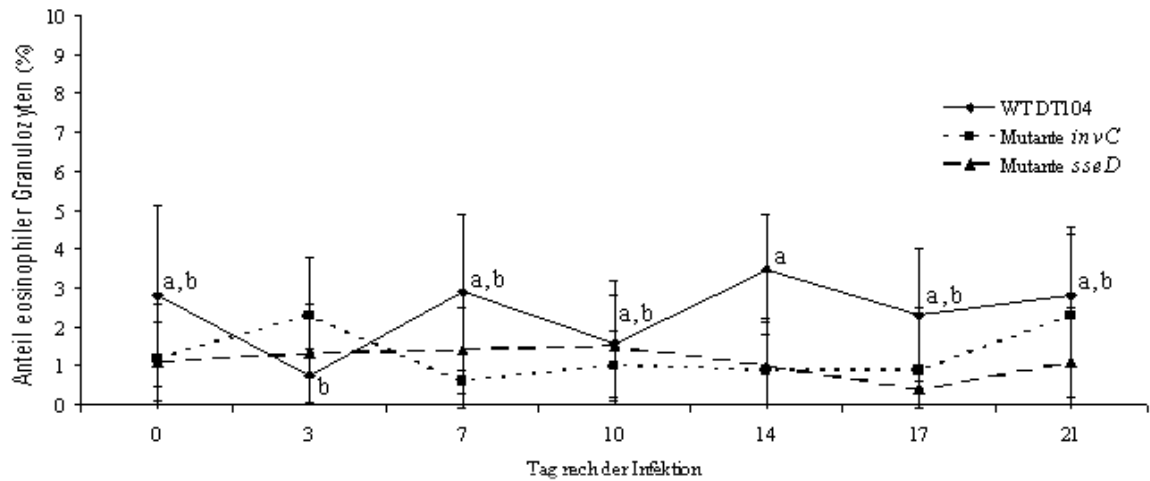


Abbildung 14. Prozentualer Anteil eosinophiler Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*. (a,b) Werte unterscheiden sich zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

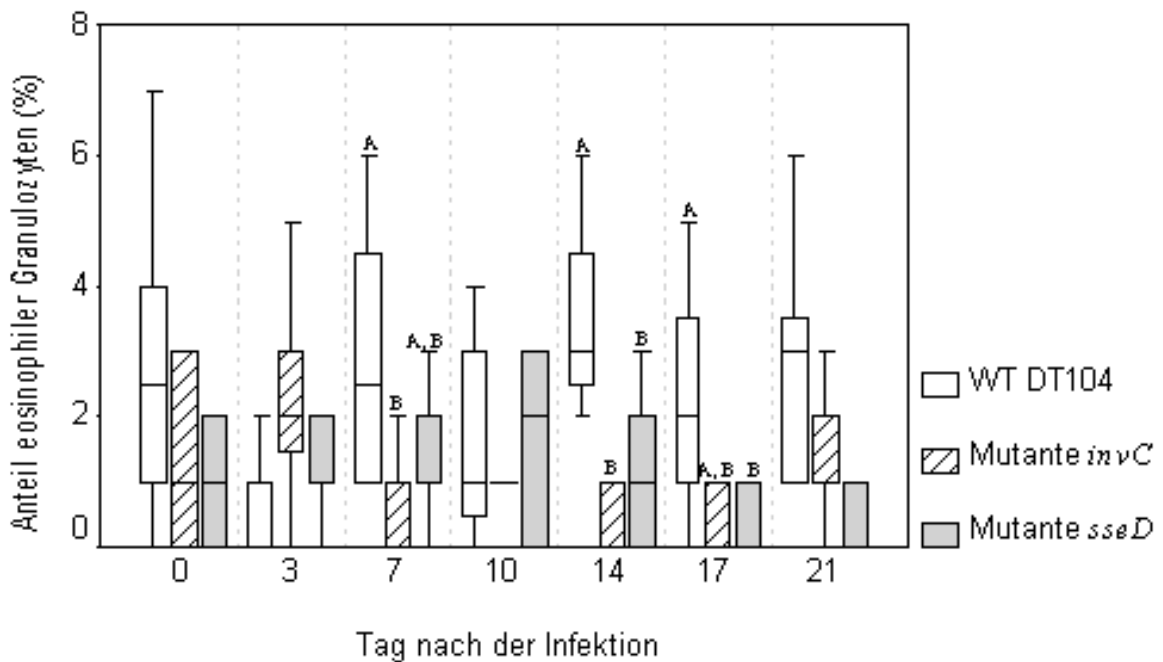


Abbildung 15. Prozentualer Anteil eosinophiler Granulozyten (Mittelwert \pm s) der infizierten Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A,B) Werte unterscheiden sich zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

Ähnlich wie die eosinophilen Granulozyten verhielt sich auch der relative Gehalt an Monozyten relativ stabil (konstant in der Gruppe der mit dem Wildtyp infizierten Tiere; geringe Veränderungen in beiden Mutantengruppen; Abbildung 16). Im Vergleich der Gruppen waren Unterschiede an den Tagen 10, 17 und 21 deutlich; auch hier hatten Wildtyp-infizierte Tiere relativ mehr Monozyten (Abbildung 17).

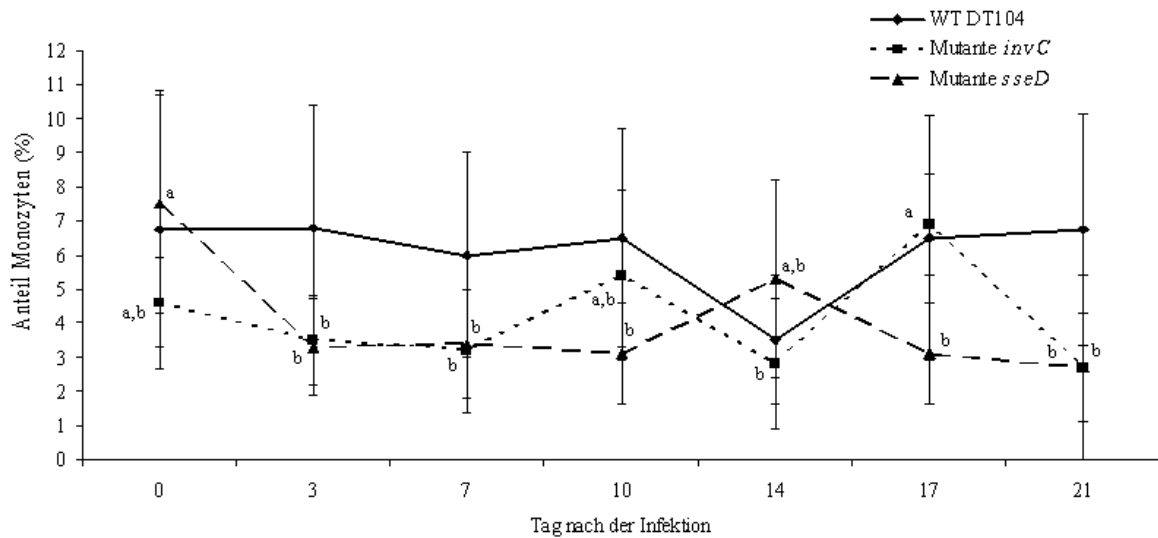


Abbildung 16. Prozentualer Anteil an Monozyten (Mittelwert \pm s) bei infizierten Schweinen. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (a,b) Werte unterscheiden sich zwischen den Tagen für eine und dieselbe Infektionsgruppe ($P \leq 0,05$).

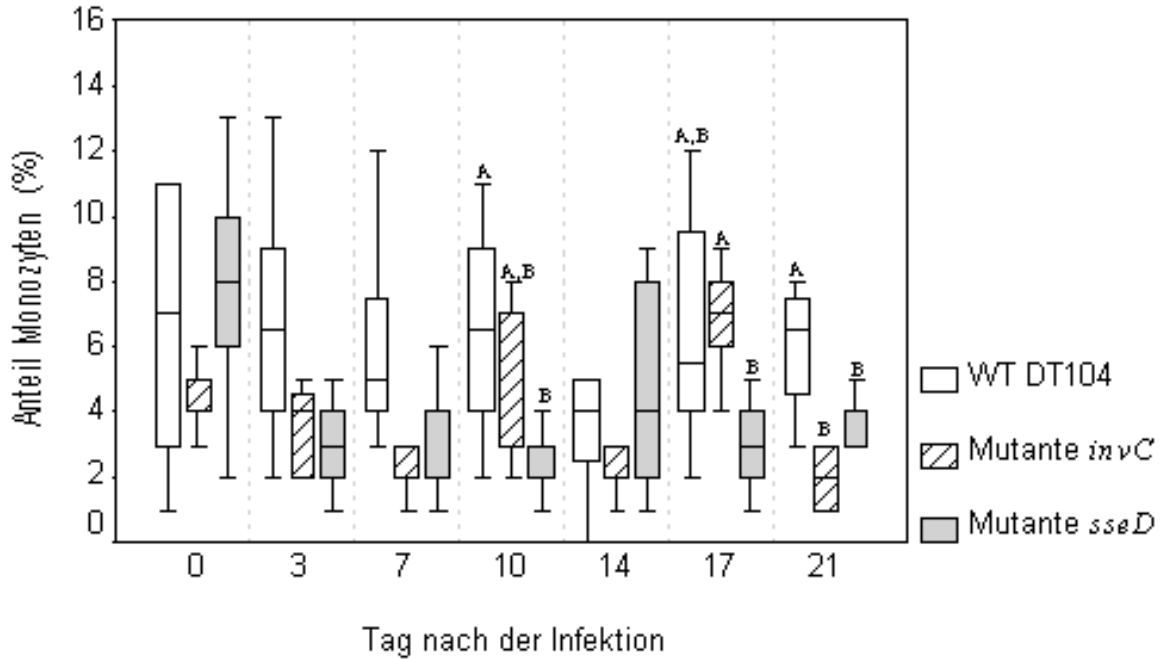


Abbildung 17. Prozentualer Anteil an Monozyten (Mittelwert \pm s) bei infizierten Schweinen. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A,B) Werte unterscheiden sich zwischen den Infektionsgruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

4.3 Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *S. Typhimurium* DT104

4.3.1 Ausscheidung mit den Faeces

Die Untersuchung der Faeces auf *S. Typhimurium* DT104 erfolgte in Anlehnung an die ISO 6579. Vor der Infektion waren alle Schweine frei vom Stamm *Salmonella* Typhimurium. Unabhängig vom Infektionsstamm (d.h. Wildtyp oder Mutante) schieden 100 % der infizierten Schweine bis Tag 5 nach der Infektion den jeweiligen Stamm mit den Faeces aus (Abbildung 18).

An nachfolgenden Untersuchungstagen war dieser Prozentsatz variabel, ohne dass sich die Gruppen im Prozentsatz positiv befundeter Tiere unterschieden (Abbildung 18). Er variierte zwischen 62,5 bis 100 % bei Tieren, die den Wildtyp erhielten, betrug 55,6 % bis 100 % bei

Tieren, die mit der *invC::aphT*-Mutante infiziert wurden und 75 % bis 100 % bei Schweinen, welche die *sseD::aphT*-Mutante bekamen.

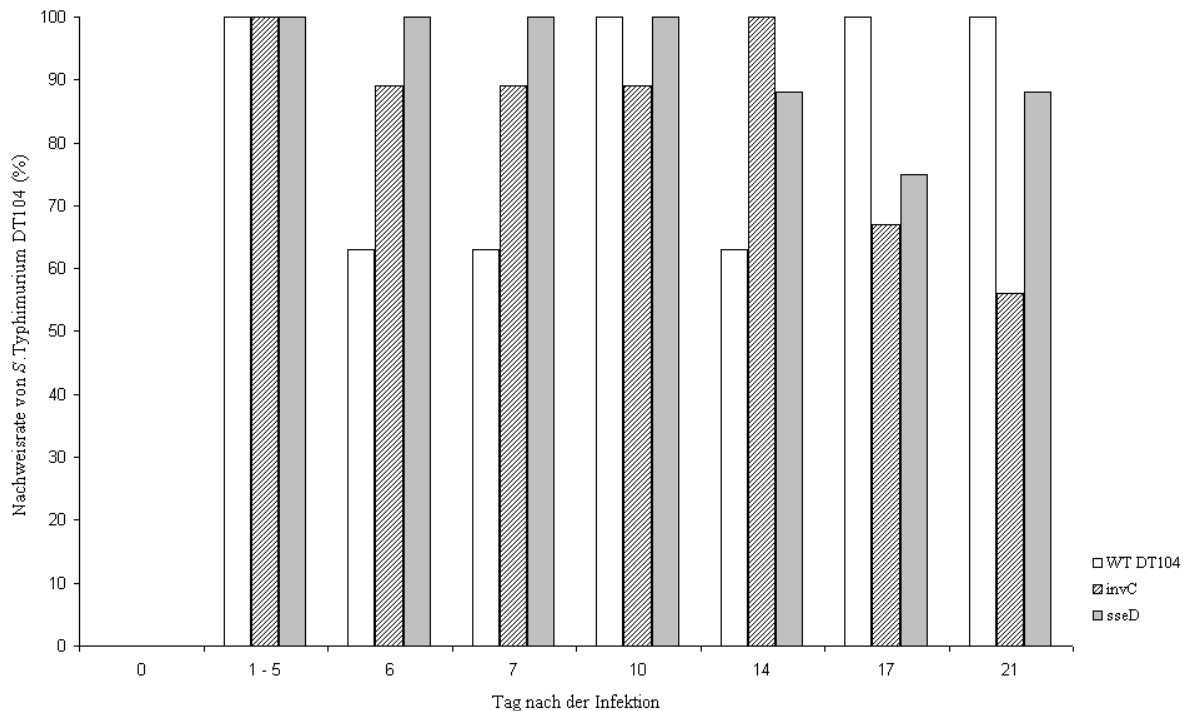


Abbildung 18. Kultureller Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 (in % der infizierten Tiere) in Faeces infizierter Schweine. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*.

4.3.2 Besiedlung von Organen und Geweben

Insgesamt wurden 375 Gewebeproben kulturell auf *S. Typhimurium* DT104 untersucht. Jeweils 120 stammten von Tieren, die mit dem *S. Typhimurium* DT104-Wildtypstamm bzw. der *sseD::aphT*-Mutante infiziert wurden, während 135 Proben von Schweinen zur Untersuchung gelangten, welche die *invC::aphT*-Mutante erhielten. Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an die ISO 6579.

Von den untersuchten Gewebeproben waren insgesamt 218 (58,1 %) positiv. Davon entfielen 79 (65,8 %) auf Gewebeproben der mit der *sseD::aphT*-Mutante infizierten Schweine, 77 (64,2 %) auf Tiere, die den *S. Typhimurium* DT104-Wildtypstamm erhielten, während nur 62

(45,9 %) Proben der mit der *invC::aphT*-Deletionsmutante infizierten Schweine positiv waren ($P \leq 0.05$).

Insgesamt stammten 120 Gewebeprobe von Schweinen ($n = 8$), welche mit dem Wildstamm von *S. Typhimurium* DT104 infiziert wurden. Alle Tiere dieser Gruppe waren positiv in den nachfolgend genannten Organen: Tonsille, Ileum, Caecum Colon, Mandibularlymphknoten und Ileo-Caecal-Lymphknoten (Abbildung 19). Bei fünf Tieren konnte *S. Typhimurium* DT104 im Lungengewebe und bei 4 Tieren im Lungenlymphknoten nachgewiesen werden. Bei zwei Tieren gelang der Nachweis in der Leber und Muskulatur. Alle Tiere waren negativ in Milz und Galle.

Von den Tieren ($n = 9$), die mit der *invC::aphT*-Mutante infiziert wurden, entstammten 135 Gewebeprobe. Alle Tiere waren in Mandibularlymphknoten und im Colon positiv (Abbildung 19). Häufig wurde die *invC::aphT*-Mutante auch aus Proben des Caecums, den Ileo-Cecal- sowie Colon- und Jejunal-Lymphknoten isoliert. Jejunum, Lunge und dazugehörige Lymphknoten waren jeweils nur bei einem Tier positiv, während Leber, Milz und Gallenflüssigkeit negativ blieben.

Die 120 Gewebeprobe der Tiere ($n = 8$), die mit der *sseD::aphT*-Mutante infiziert wurden, waren wie folgt für genannte Mutante positiv (Abbildung 19): bei allen Tieren Tonsille, Ileum, Caecum, Colon, Mandibular-, Ileo-Cecal-, und Colon-Lymphknoten; bei sieben Tieren Jejunal-Lymphknoten; bei sechs Tieren Jejunum; bei vier Tieren Lunge und Lungenlymphknoten; bei zwei Tieren Leber; bei jeweils einem Tier Milz und Muskel. Die Gallenflüssigkeit war bei allen Probanden negativ.

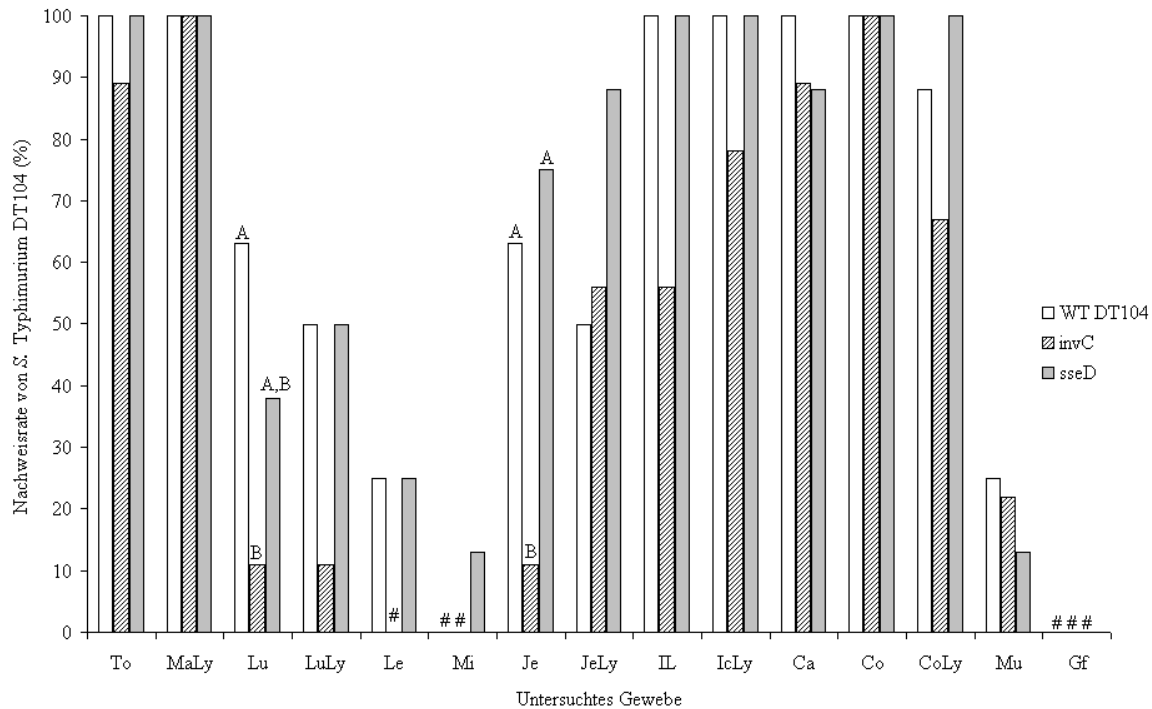


Abbildung 19. Kultureller Nachweis von *S. Typhimurium* (in % der infizierten Schweine) in Gewebeprobe. Tag 0 = Tag der Infektion mit dem Wildtyp (WT) DT104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT*, (A–B) Werte unterscheiden sich signifikant für ein und dasselbe Gewebe ($P \leq 0,05$). # = kein Nachweis. To = Tonsille; MaLy = Mandibular-Lymphknoten; Lu = Lunge; LuLy = Lungen-Lymphknoten; Le = Leber; Mi = Milz; Je = Jejunum; JeLy = Jejunal-Lymphknoten; IL = Ileum; IcLy = Ileocaecal-Lymphknoten; Ca = Caecum; Co = Colon; CoLy = Colon-Lymphknoten; Mu = Muskel; Gf = Gallenflüssigkeit.

Die Tonsillen waren gruppenunabhängig am stärksten besiedelt (Abbildung 20). Im Vergleich der Gruppen war die Deletionsmutante-*sseD::aphT* dabei offensichtlich effektiver als die Deletionsmutante-*invC::aphT*. Auch bei anderen Organen gab es Unterschiede. Wie bei den Tonsillen wurde die Deletionsmutante-*sseD::aphT* auch häufiger in mandibularen, jejunalen Lymphknoten und Ileo-Caecal-Lymphknoten gefunden (Abbildung 20). In anderen Organen wie z.B. Ileum, Caecum und Jejunum gab es dagegen keine Unterschiede zwischen den Stämmen.

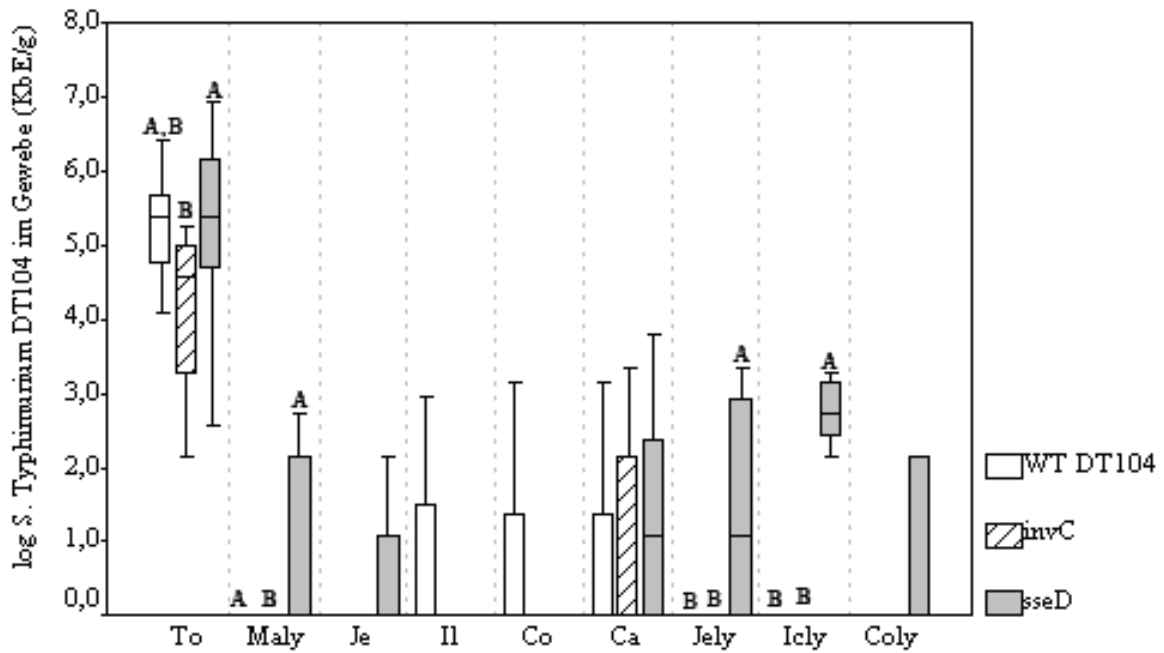


Abbildung 20. Quantitativer Nachweis des Wildtyps (WT) DT 104, der Deletionsmutante *invC::aphT* bzw. der Deletionsmutante *sseD::aphT* in Gewebeproben. Die y-Achse zeichnet die Werte als Exponent zur Basis 10. To = Tonsille; Maly = Mandibular-Lymphknoten; Je = Jejunum; Il = Ileum; Co = Colon; Jely = Jejunal-Lymphknoten; Icly = Ileocaecal-Lymphknoten; Coly = Colon-Lymphknoten. (A,B) Werte unterscheiden sich signifikant zwischen den Gruppen für ein und denselben Tag ($P \leq 0,05$).

4.3.3 Qualitative PCR zur Identifizierung und Nachweis von *S. Typhimurium* DT104

Insgesamt wurden 252 positive Kotproben und alle 218 kulturell positiven Gewebeproben mit Hilfe der PCR untersucht. Alle Proben waren *S. Typhimurium* positiv. Es wurde ausschließlich der jeweils zur Infektion verwendete Stamm gefunden. Die Ergebnisse der PCR sind in den Abbildungen 21 und 22 veranschaulicht.



Abbildung 21. PCR-Produkte zum Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp sowie der *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in ausgewählten Gewebeproben experimentell infizierter Schweine. M = Längenmarker; a = Positivkontrolle *invC::aphT*-Mutante; b = Positivkontrolle *sseD::aphT*-Mutante; c = Positivkontrolle DT104 Wildtyp mit *invC*-Primer; d = Positivkontrolle DT104 Wildtyp mit *sseD::aphT*-Primer, ÷ = Negativkontrolle, To = Tonsille; Maly = Mandibular-Lymphknoten; Icly = Ileocaecal-Lymphknoten.

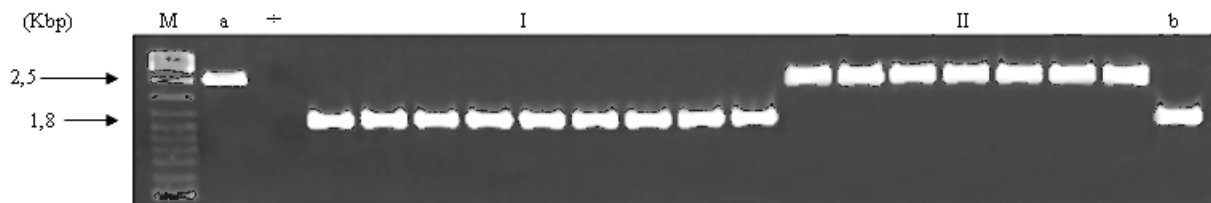


Abbildung 22. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, Deletionsmutanten in Faeces von ausgewählten Schweinen, die entweder mit der *sseD::aphT* (I)- oder der *invC::aphT*-Mutante (II) infiziert wurden. M = Marker, a = *invC::aphT*-Mutante-Positivkontrolle, ÷ = Negativkontrolle, I = Kotproben der *sseD::aphT*-Mutantengruppe, II = Kotproben der *invC::aphT*-Mutantengruppe, b = *sseD::aphT*-Mutante Positivkontrolle.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war der Pathogenitätsvergleich des Wildstamms von *Salmonella* Typhimurium DT104 zu seinen Deletionsmutanten *sseD::aphT* und *invC::aphT*. Dieses Serovar ist ubiquitär und weist keine Wirtsspezifität auf. Alle landwirtschaftlichen Nutztiere können sich infizieren und mit zum Teil schwerwiegender klinischer Symptomatik erkranken. Gleiches gilt für den Menschen, der sich durch Umgang mit infizierten Tieren und von Tieren stammenden Produkten anstecken kann. Dem Schwein, vor allem aber Schweinefleischprodukten, kommt dabei herausragende Bedeutung zu. Wenn auch dies nicht der öffentlichen Wahrnehmung entspricht, wo eher die unlängst in 2011 aufgetretene Epidemie mit EHEC (Enterohämorrhagische *Escherichia coli*) in Deutschland diskutiert wird, ist die Situation bezüglich *S. Typhimurium* DT104 nicht weniger dramatisch, da sich jährlich immer noch viele Tausend Menschen mit *S. Typhimurium* DT104 infizieren und erkranken. Ähnlich wie bei EHEC ist besonders brisant, dass *S. Typhimurium* DT104 über eine Multiresistenz gegenüber Antibiotika verfügt und somit Erkrankungen schwer therapierbar sind. Insofern ist das hier beschriebene Forschungsvorhaben von großer Relevanz, da es dazu beiträgt, die Pathogenitätsmechanismen von *S. Typhimurium* DT104 besser zu verstehen, wirksam zu bekämpfen bzw. Infektionen mit diesem Bakterium zu verhindern.

Wie schon vormals bei Hühnern und Mäusen gezeigt (PORTER et al. 1993; MAHAN et al. 1993; FINLAY 1994; HENSEL et al. 1995) demonstrierten die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse eindrucksvoll, dass Infektionen mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium* zu einer schweren Erkrankung beim Schwein führen können. Es wurde ferner gezeigt, dass beide in dieser Arbeit verwendeten Mutanten weniger krankmachend sind. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die Deletionen in den *sseD::aphT* bzw. *invC*-Bereichen tatsächlich zu Veränderungen bestimmter Eigenschaften geführt haben, die Teil der Pathogenitätsmechanismen für das Schwein sind. Es ist zu vermuten, dass *invC* in die Steuerung des Invasionsvermögens eingebunden ist.

5.1 Methodische Überlegungen

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung auf *Salmonella* Medien verwendet, wie sie vor der Modifikation im Jahre 2008 laut ISO 6579 vorgeschrieben waren. Grund dafür ist, dass die hier beschriebenen Untersuchungen vor oben genannter Modifikation stattfanden. Die Modifikation betrifft die Selektivanreicherung mittels Rappaport-Vassiliadis (RV)-Medium. Während vor der Modifikation flüssiges Medium verwendet wurde, schreibt die modifizierte ISO 6579 im Anhang D vor, halbfestes Rappaport-Vassiliadis-Medium (MRSV-Medium) zum Nachweis von Salmonellen in Kot- und Umweltproben zu nutzen. Dadurch sollten sowohl Sensitivität und Spezifität der Salmonellen-Diagnostik erhöht als auch Arbeits- und Material-Aufwand reduziert werden (ANONYMUS 2005; ANONYMUS 2007). Ob einzelne Salmonellen-positive Proben deshalb in dieser Arbeit unerkannt blieben, bleibt offen. Wenn dieser Fehler tatsächlich systematisch bestand, war er gruppenübergreifend ohne Konsequenzen für den Gruppenvergleich. Kulturell als positiv befundete Proben waren hingegen tatsächlich positiv, da sie alle mittels PCR untersucht und bestätigt wurden.

5.2 Klinische Symptomatik

Die unterschiedliche Virulenz der in dieser Arbeit verwendeten *S. Typhimurium* DT104 Stämme konnte eindeutig demonstriert werden. Je nach Stamm variierte die klinische Symptomatik zum Teil erheblich. Schwere klinische Verläufe wurden nach Infektion mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium* DT104 beobachtet, während nach Infektion mit den Mutanten vergleichsweise milde klinische Erscheinungen auftraten. Das betraf sowohl Morbidität, Krankheitsintensität als auch die Dauer der Erkrankung. Während alle mit dem Wildtyp infizierten Tiere mit unterschiedlichen Symptomatiken klinisch krank waren, wurden bei Verwendung der Mutanten nur einzelne Tiere krank. Fast alle der in dieser Studie beurteilten klinischen Parameter waren bei einem oder mehreren mit dem Wildtyp infizierten Tieren zum Teil zeitgleich verändert, während bei Verwendung der Mutanten mal der eine, mal der andere Parameter verändert war und äußerst selten dieselben Tiere betraf oder Veränderungen zeitgleich zu beobachten waren. Traten klinische Veränderungen auf, waren die Symptome stark ausgeprägt, wenn mit dem Wildtyp infiziert wurde. Mutanten verursachten dagegen nur milde klinische Veränderungen. Waren Schweine mit dem Wildtyp infiziert und erst einmal

krank, hielt die Erkrankung über mehrerer Tage an. Nach Verwendung der Mutanten waren Krankheitssymptome eher sporadischer Natur und verschwanden schon am darauffolgenden Tag. Es ist sicher berechtigt zu konstatieren, dass sich nach Infektion mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium* DT104 eine Erkrankung *per definitionem* (WIESNER und RIBBECK 1991) entwickelte, während die Deletionsmutanten wohl eher untypisch milde klinische Verlaufsformen auslösten. Das zeigt auch die Gewichtsentwicklung, die bei den mit dem Wildtyp infizierten Tieren geringer als bei denjenigen Schweinen war, die mit Mutanten oral inokkuiert wurden. Bekanntlich fressen kranke Tiere weniger und nehmen während der Zeit der Erkrankung weniger zu (BALAJI et al. 2000). So ist allein anhand der klinischen Symptomatik zu vermuten, dass Deletionen im *sseD*-Gen oder *invC*-Gen die Pathogenitätsseigenschaften der Salmonellen abschwächen. Das gilt wie in dieser Arbeit gezeigt offensichtlich für das Schwein genauso wie dies für die Maus gezeigt werden konnte (HEESEMAN und HENSEL 2000) und das Huhn (PORTER et al. 1993). Die in dieser Arbeit beobachtete klinische Symptomatik nach Infektion mit dem Wildtyp ist bekannt und wurde wiederholt beschrieben (WOOD et al. 1989; WOOD und ROSE 1992; FEDORKA-CRAY et al. 1994; NIELSEN et al. 1995; SCHERER et al. 2008). Die Beobachtung milderer Verläufe durch die in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten ist neu. Da sich die Mutanten nicht wesentlich in den durch sie hervorgerufenen klinischen Erscheinungen unterschieden, ist davon auszugehen, dass die durch die Deletion hervorgerufenen Funktionsänderungen oder gar -verluste in den deletierten Genomsabschnitten ähnlich effektiv in der Abmilderung klinisch relevanter Pathogenitätsmechanismen waren. Wie eingangs erwähnt, steuert *sseD* das Überleben der Salmonellen, während *invC* für die Invasivität verantwortlich ist. Die vorhandenen klinischen Symptomatiken lassen darauf schließen, dass *invC*-deletierte Mutanten im Unterschied zum Wildtyp vergleichsweise selten in den Organismus gelangten, während Mutanten mit Deletion im *sseD*-Bereich zwar in den Organismus gelangten, jedoch effektiver als der Wildtyp und die *invC::aphT*-Mutante aus dem Organismus des Schweins eliminiert wurden.

5.3 Weißes Blutbild

Anhand der Beschreibung des weißen Blutbildes sollte geprüft werden, ob und wie effektiv sich die einzelnen Salmonellenstämme der Immunabwehr des Wirtsorganismus widersetzen

können. Wie schon vormals beschrieben (COE et al. 1992; VAN DIEMEN et al. 2002), stieg die Gesamtleukozytenzahl nach Infektion mit dem Wildtyp bis zum Tag 10 nach der Infektion an, um danach langsam bis zum Versuchsende abzufallen. Diese offensichtlich für das Schwein typische Reaktion (COE et al. 1992; VAN DIEMEN et al. 2002) blieb aber bei denjenigen Tieren, die mit den Deletionsmutanten infiziert wurden, aus. *SseD::aphT*-Infektionen führten zwar zu einem Anstieg in der Anzahl der Leukozyten am Tag nach der Infektion. Dieser Anstieg war jedoch transient und schon am darauffolgenden Tag wieder abgeklungen. Klassisch und wie von Schilling (zitiert aus KRAFT und DÜRR 2005) beschrieben, verhielten sich die Lymphozyten, wenn mit dem Wildstamm infiziert wurde. Nach einem initialen protrahierten und moderaten Abfall bis zum Tag 7 nach der Infektion, erfolgte eine ebenso protrahierte Erholung. Der initiale Abfall in der Anzahl an Lymphozyten war möglicherweise das Resultat eines eingangs gestiegenen Verbrauchs vermutlich vor allem zytotoxischer T-Lymphozyten, die bei der inaten d.h. sofortigen Immunantwort auf die Infektion beteiligt waren. Dieses klassische Muster fehlte nach Infektion mit den Deletionsmutanten. Lymphozyten sind Bestandteil der humoralen Immunabwehr. Offensichtlich wurde dieses durch den Wildstamm effektiver stimuliert als nach den Infektionen mit den Mutanten. Dieser postulierte Effekt kann schwerlich allein numerisch begründet sein, da nach o.g. Theorie *sseD::aphT*-Mutanten in gleicher Anzahl wie der Wildtyp in den Organismus gelangt sein müssten. Die Lymphozytenkurve des Wildtyps unterschied sich jedoch von beiden Mutanten in gleicher Weise. Möglicherweise besitzen solchermaßen spezifisch deletierte Salmonellen und solche des Wildtypes unterschiedliche immunogene Eigenschaften. Da es lediglich die Deletion ist, die Mutanten vom Wildtyp unterscheiden, ist logisch anzunehmen, dass ein Zusammenhang zur Deletion besteht. Wodurch auch immer letztlich verursacht, empfehlen sich beide Deletionsmutanten aufgrund der verminderten Immunantwort nicht als Kandidaten für Impfstoffe. Auch wenn, wie gewünscht, kaum klinische Symptome auftraten, ist mit einer eher schwachen humoralen Immunantwort zu rechnen. Unterschiede in der Immunantwort im Vergleich von Wildtyp und Mutanten sind auch im Vergleich der neutrophilen Granulozyten ersichtlich. Wie zu erwarten, verursachte der Wildtyp eine eindeutige Reaktion (Anstieg) im Anschluss an die Infektion. Dieses Phänomen wurde schon vormals beschrieben (VAN DIEMEN et al. 2002) und bestätigt, dass neutrophile Granulozyten bei einer Infektion mit Salmonellen wie auch bei anderen bakteriellen Infektionen Teil der unspezifischen Immunabwehr sind. Dieser Effekt blieb nach den Infektionen mit den Deletionsmutanten weitestgehend aus.

Offensichtlich unterscheiden sich Wildtyp und Mutante auch in Eigenschaften, welche die zelluläre Immunantwort des Wirtsorganismus beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind nochmals Überlegungen zur Klinik angebracht. Von vielen anderen bakteriellen Infektionen beim Schwein einschließlich des vor allem durch coliforme Bakterien verursachte MMA-Syndroms ist bekannt, dass klinische Verlaufsformen (inklusive Fieber, Inappetenz und Erbrechen) durch chemotaktische Substanzen wie Interleukine und Zerfallsprodukte der Bakterien (Endotoxine) verursacht werden (REINER et al. 2007). Bakterielle Zerfallsprodukte entstehen auch als Resultat der zellulären Abwehr. Neutrophile Granulozyten sind zur Phagozytose befähigt (WIESNER und RIBBECK 1991). Wo Abwehrmechanismen mit neutrophilen Granulozyten versagen oder nur vermindert funktionieren, wie in dieser Studie bei der Infektion mit den Deletionsmutanten möglicherweise erfolgt, werden auch wenige chemotaktische Substanzen vorhanden sein und bakterielle Zerfallsprodukte entstehen und deshalb möglicherweise auch weniger/keine klinische Symptome auftreten. Die hier skizzierten „*pathways*“ finden durch die Ergebnisse der Arbeit von Brumme Bestätigung (BRUMME 2006; BRUMME et al. 2007). In diesen Arbeiten wurden dieselben Schweine und gleiches Versuchsdesign genutzt, sich jedoch vornehmlich auf die Untersuchung von Entzündungsmediatoren (Interleukin 2 und 4 sowie Interferon γ) und Antikörpern (IgA, G und M) konzentriert. Die Expression aller drei Entzündungsmediatoren war bei denjenigen Schweinen, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, höher als bei den Tieren, welche die Deletionsmutante erhielten. Ähnliches war bei den untersuchten spezifischen Antikörpern festzustellen. Es wurde unter anderem geschlussfolgert, dass sowohl die zelluläre wie auch die humorale Immunantwort bei mit dem Wildstamm infizierten Tieren ausgeprägter als bei Schweinen ist, die mit einer der beiden Deletionsmutanten infiziert wurden. Interessant ist auch, dass sich beide Mutanten in der Immunantwort unterschieden. Die durch *sseD::aphT*-ausgelöste Reaktion (gemessen an der Expression von Interleukin 4 und Interferon γ) war heftiger als bei Verwendung der *invC::aphT*- Deletionsmutante (BRUMME 2006; BRUMME et al. 2007). Ähnliches wurde in der vorliegenden Arbeit bei der klinischen und labordiagnostischen Beurteilung sowie bei der Bewertung der Invasivität beobachtet.

Die Ergebnisse der Bestimmung eosinophiler Granulozyten und von Monozyten waren indifferent und erlauben keine substantielle Diskussion im Hinblick auf die Pathogenität des jeweiligen Infektionsstammes. Eosinophile Granulozyten sind mononukleäre Zellen, die

vermehrt bei Allergien auftreten und bei der Abwehr von Parasitosen und an der Rekonvaleszenz des gestörten Organs/Gewebes beteiligt sind (EDFORS-LILJA et al. 1994; KRAFT und DÜRR 2005). Monozyten sind phagozytierende Zellen und wesentlicher Bestandteil der unspezifischen zellulären Abwehr (EDER 1987). Die Anzahl von Monozyten im Blut unterliegt generell großen Schwankungen (EDER 1987). Folgt man der klassischen Infektiologie, wäre zu erwarten gewesen, dass die eosinophilen Granulozyten in der Phase der Rekonvaleszenz einige Zeit nach der vorangegangenen Infektion mit *S. Typhimurium* ansteigen (KRAFT und DÜRR 2005). Dieses klare Muster war, wie oben angedeutet, bei keinem der verwendeten Infektionsstämme zu beobachten.

5.4 Ausscheidung und Organbesiedlung

Die Untersuchungen der Kotproben zum kulturellen Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp und Deletionsmutanten erfolgten wie in der ISO 6579 vorgeschrieben. Altrock (2000) empfahl, diese Untersuchungen kontinuierlich und in engen Intervallen durchzuführen, um eine sichere Aussage über die Dauer der Ausscheidung treffen zu können. Dies wurde befolgt und der Beprobungsplan analog engmaschig konzipiert. Prinzipiell lassen die Ergebnisse der Kultur folgende Schlussfolgerungen zu: Nach oraler Infektion von Salmonellen werden die Schweine Ausscheider. In diesem Verhalten unterschieden sich Wildtyp nicht von Mutanten. Die Salmonellen werden gleichwohl intermittierend ausgeschieden. Auch in dieser generellen Eigenschaft verhielten sich die in dieser Arbeit verwendeten Stämme gleich. Zwar wurden in der Anzahl „Ausscheider je Untersuchungstag“ vereinzelt Unterschiede beobachtet, jedoch weitab von jeglicher Signifikanz. Das Schweine *S. Typhimurium* intermittierend ausscheiden können, ist bekannt (WOOD et al. 1989; WOOD und ROSE 1992; FEDORKA-CRAY et al. 1994; NIELSEN et al. 1995; SCHERER et al. 2008). Es wird vermutet, dass latent infizierte Tiere dann ausscheiden, wenn sie gestresst werden oder andere die Ausscheidung begünstigende Konstellationen eintreten (ISAACSON et al. 1999; LARSEN et al. 2003; LOYNACHAN et al. 2004; BOUGHTON et al. 2007; WILLIAMS et al. 2008). Es konnte zudem beobachtet werden, dass Salmonellen ausgeschieden werden, ohne dass die Tiere zwangsläufig klinisch erkranken. Obwohl dies schon seit langem bekannt ist (WOOD et al. 1989; FEDORKA-CRAY et al. 2000; BOYEN et al. 2008; SCHERER et al. 2008; VAN PARYS et al. 2011), zeigen auch diese Versuche, dass

latente Infektionen typisch sind. Latente Träger wurden vor allem in der Gruppe der mit den Deletionmutanten infizierten Tiere beobachtet. Unsere Befunde bestätigen, dass die Fähigkeit zur Persistenz offensichtlich nicht an die Virulenz gekoppelt ist (WALES et al. 2011). Der Fakt, dass einzelne Tiere (vor allem die mit Deletionmutanten infizierten) viele Tage nach der vorangegangenen Infektion, wenn auch nur milde Krankheitsymptome aufwiesen, mag als zusätzliches Indiz einer faktoriellen Genese der Salmonellose des Schweines gelten. Möglicherweise erfuhren diese Schweine eine für sie unbeherrschbare Belastung (zum Beispiel als Folge der Versuchsdurchführung), die zu kurzzeitigen milden klinischen Verlaufsformen führten.

Zum Nachweis der Invasivität der verwendeten Salmonellenstämme wurden verschiedenste Gewebe- und Organproben sowohl kulturell als auch mittels PCR auf Salmonellen untersucht. Alle in der Kultur positiven Ergebnisse konnten in der PCR bestätigt werden. Die kulturellen Anzucht-Ergebnisse dieser Arbeit sind damit zuverlässig validiert. Generell ist festzuhalten: Alle Stämme, d.h. sowohl Wildtyp als auch die Mutanten sind invasiv, da sie sich prinzipiell in fast allen der beprobten Organe nachweisen ließen. Damit bestätigt sich, dass sich *Salmonella* Typhimurium über das lymphatische und blutführende System in Organismen ausbreiten kann und verschiedene Zelltypen invadiert (SANTOS et al. 2003; HAPFELMEIER et al. 2005; HARAGA et al. 2008). Makrophagen dienen dabei als Vehikel. *S. Typhimurium* kann in ihnen überleben und sich dort sogar vermehren (ALTHOUSE et al. 2003). Allerdings gab es nicht unerhebliche Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen, vor allem im Hinblick auf das Muster der Organbesiedlung, aber auch mit Blick auf die Häufigkeit des Befalls einzelner Organe. Interessant war, dass sich die *sseD::aphT*-Mutante als gleichermaßen invasiv wie der Wildtyp herausstellte. Obwohl die Invasivität des Wildtyps bekannt ist (MEYERHOLZ et al. 2002; NIEWOLD et al. 2007), erstaunt dieses Ergebnis deshalb, da bisher angenommen wurde, dass die *sseD::aphT*-Mutante über eine verminderte Überlebensfähigkeit in Makrophagen verfügt und darum recht effektiv durch den Organismus eliminiert wird. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit – vor allem unter Berücksichtigung der ausbleibenden zellulären Immunantwort – kann vermutet werden, dass sich diese Mutante womöglich (auch) recht effektiv vor der zellulären Immunabwehr des Wirtsorganismus maskieren konnte. Etwaige dafür zugrunde liegende Mechanismen müssen noch untersucht werden. Fakt ist, dass sich die pathogenen Eigenschaften von *sseD*-Gen beim Schwein vor allem im Hinblick auf dessen Fähigkeit zur Invasion deutlich von denen bei der

Maus unterscheiden, bei der sich *sseD*-Gen von *Salmonella* als wenig invasiv herausstellte (HENSEL 2000; HEESEMANN und HENSEL 2000; GALLOIS et al. 2001; HOLZER und HENSEL 2010). Dieses Ergebnis verdeutlicht auch, wie wichtig vergleichende Untersuchungen an bzw. mit der jeweiligen Zielspezies sind.

Im Gegensatz zu *sseD* bewies *invC* eine geringere Invasivität bzw. Fähigkeit, sich im Wirtsorganismus zu verbreiten und Organe zu kolonisieren. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet, da *invC*, wie schon mehrfach erwähnt, über ein deletiertes und damit in seiner Funktion verändertes *invC* Gen verfügt. Sämtliche Schweine waren unabhängig vom verwendeten Infektionsstamm in Tonsillen, Mandibularlymphknoten und im Colon mit Salmonellen besiedelt. Diese Besiedlungsorte sind typisch und gehören zu denjenigen, in denen Salmonellen bevorzugt persistieren (WOOD et al. 1989; WOOD und ROSE 1992; HURD et al. 2001; MARG et al. 2001; ROESLER et al. 2004; SCHERER et al. 2008; SZABO et al. 2008; VAN PARYS et al. 2011). Andere Organe, wie Leber, Muskulatur und Milz waren wesentlich seltener besiedelt oder kulturell negativ. Dieses Ergebnis ist fleisch- und lebensmittelhygienisch von Bedeutung, da es sich bei Leber und Muskulatur um vom Schwein stammende Vorprodukte handelt, die verarbeitet oder unverarbeitet in die menschliche Nahrungskette gelangen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit in ihrer Gesamtheit zeigen, dass der Wildtyp von *S. Typhimurum* erwartungsgemäß pathogener ist als die beiden Deletionsmutanten *sseD::aphT* und *invC::aphT*. Diese Interpretation bezieht sich vor allem auf die klinische Symptomatik und auf Veränderungen der Blutbilder, die sich vor allem beim Wildtyp manifestierten. In der Fähigkeit zur Ausscheidung (auch intermittierend) bestanden bei den Versuchsschweinen keine Unterschiede. Anders in der Invasivität (d.h. Fähigkeit der Verbreitung im Organismus und Besiedlung von Organen); *invC::aphT* invadierte seltener als *sseD::aphT*, die ein ähnlich starkes Invasionsvermögen wie der Wildtyp aufwies. Damit korrespondieren die Ergebnisse dieser Arbeit gut mit denen von BRUMME et al. (2007) und BRUMME (2006), die, wie oben erwähnt, vornehmlich basierend auf immunologischen Parametern ebenso fand, dass die *sseD::aphT*-Deletionsmutante pathogener als die *invC::aphT*-Mutante ist.

5.5 Schlussbetrachtung

Angesichts des zoonotischen Potentials von *S. Typhimurium* und vor allem auch durch die Gesetzgebung legitimierten Anstrengungen zur Elimination dieses Bakteriums aus der menschlichen Nahrungskette durch stringente Monitoring- und Eradikationsprogramme sowie durch die Einhaltung einwandfreier Hygienestandards mag sich die Bedeutung der Salmonellen eher durch ihre Fähigkeit zur Invasivität, Persistenz und dauerhaften Ausscheidung als denn allein durch die klinischen Symptome beim Wirt definieren. Wird dieses als Bewertungsgrundlage genutzt, ist zumindest die Infektion mit der *sseD::aphT*-Deletionsmutante nicht weniger klinisch auffällig (und in diesem Sinne „gefährlich“) als die Infektion mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium*. Ohne erkennbare klinische Erscheinungen bei den Versuchsschweinen auszulösen, invadierte dieser Stamm den Wirtsorganismus in einer Weise, wie sie nur vom Wildtyp bekannt ist. Da für die Verbreitung der Salmonellen im Organismus Makrophagen als Vehikel dienen, muss zukünftig die Frage beantwortet werden, ob *seeD* prinzipiell für die Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* in Makrophagen kodiert, oder ob es nicht auch eine spezies-spezifische Komponente gibt. Anders hingegen *invC::aphT*, die sich bei Betrachtung aller genannten Kriterien wie klinische Symptomatik und Invasivität als weniger pathogen erwies. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Deletion im *invC*-Locus des Bakteriengenoms tatsächlich zu einer Veränderung in dessen Funktion führte, die dann im Infektionsgeschehen beim Schwein mit einer Beeinträchtigung der Invasivität der *invC::aphT*-Mutante einherging.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Haukur Lindberg Sigmarsson

PATHOGENITÄTSVERGLEICH VON *SALMONELLA* TYPHIMURIUM DT104 WILDTYP UND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM DELETIONSMUTANTEN (*sseD::aphT* & *invC::aphT*) IN PERSISTENT INFIZIERTEN SCHWEINEN

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

Eingereicht im Februar 2012

74 Seiten, 22 Abbildungen, 23 Tabellen, 241 Literaturstellen, 14 Seiten Anhang

Schlüsselworte: *Salmonella* Typhimurium DT104, Deletionsmutante, *invC*-Gen, *sseD*-Gen, Schwein, experimentelle Infektion

Salmonella (*S.*) Typhimurium DT104 ist ein gram-negatives Bakterium. Es weist keine Wirtsspezifität auf und gilt als Zoonoseerreger. Jährlich erkranken daran allein in Deutschland mehrere Tausend Menschen unter dem Bild einer schwerwiegenden Diarrhö mit zum Teil tödlichem Ausgang. Das Schwein gilt als eines der Reservoirs für *S. Typhimurium* DT104 des Menschen. *S. Typhimurium* DT104 gelangt über vom Schwein stammende Produkte in den menschlichen Verzehr. Die Kontrolle von *S. Typhimurium* DT104 einschließlich effektiver Eradikationsmassnahmen in unseren Schweinebeständen ist deshalb von entscheidender Bedeutung, um den Eintrag dieses Bakteriums in die menschliche Nahrungskette wenn möglich zu eliminieren. Dafür ist das Verständnis über *S. Typhimurium* DT104 einschließlich der Kenntnis seiner Pathogenitätseigenschaften notwendig. Ziel dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Pathogenität von *S. Typhimurium* DT104. Dabei wurden der Wildstamm mit zwei seiner Deletionsmutanten (*sseD::aphT* und *invC::aphT*) verglichen.

Die Untersuchungen erfolgten im Infektionsversuch an insgesamt 25 sechs Wochen alten männlichen Schweinen, die in einem vollklimatisierten Versuchsstall gehalten wurden. Den Tieren wurde im Anschluss an eine einwöchige Akklimatisierungsphase eines der nachfolgenden Stämme von *S. Typhimurium* DT104 oral in einer Konzentration von 1×10^{11} KBE verabreicht: Wildtyp (n = 8 Schweine), Deletionsmutante *sseD::aphT* (n = 8) und Deletionsmutante *invC::aphT* (n = 9). Bei den Mutanten handelt es sich um Varianten von *S. Typhimurium* DT104, die an den entsprechenden Abschnitten des Bakteriumgenoms (d.h.

sseD-Gen bzw. *invC*-Gen) deletiert wurden. *SseD* regelt die Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium* in Makrophagen, *invC* dessen Invasionsvermögen. Im Mäusemodell war die Pathogenität beider Mutanten deutlich vermindert. Nach der Infektion schloss sich ein 20 tägiger Beobachtungszeitraum an, während dessen nachfolgend genannte Parameter erfasst bzw. Proben genommen wurden: klinische Symptome (Allgemeinbefinden, Erbrechen, Durchfall, Futteraufnahme, Atmung, Temperatur); Blutentnahme für Erstellung des weißen Blutbildes; Kotentnahme zum Nachweis der Ausscheidung von *S. Typhimurium*. Einen Tag nach Ende der Beobachtung wurden die Tiere getötet und Proben von insgesamt 15 Organen (unter anderem Tonsille; Colon und Caecum sowie dazugehörige Lymphknoten; Leber; Milz; Muskulatur) genommen. Kot sowie Gewebeprobe wurden kulturell und, wenn positiv, auch mittels PCR untersucht.

Alle mit dem Wildtyp infizierten Schweine wurden mehr oder weniger stark krank. Häufig zeigten erkrankte Schweine zeitgleich mehrere Krankheitssymptome (z. B. Erbrechen und Durchfall). Die Erkrankung hielt über mehrere Tage an. Im Vergleich dazu waren die Krankheitssymptome der Tiere, die mit Mutanten infiziert wurden, mild. Nur wenige Tiere erkrankten und dann auch nur kurzzeitig. Gewöhnlich war nur einer der erfassten Parameter verändert. Typische Veränderungen im weißen Blutbild waren nur bei Wildtyp-infizierten Tieren zu beobachten, während Tiere beider Mutanten kaum auf die Infektion reagierten. Alle 25 infizierten Tiere schieden *S. Typhimurium* mit dem Kot während der ersten 5 Tage post inoculationem aus. Danach wurden in allen drei Gruppen etwa gleichviel intermittierende Ausscheider beobachtet. Zwischen 65 und 67 % der Gewebeprobe der mit dem Wildtyp und mit der *sseD::aphT*-Mutante infizierten Tiere waren sowohl in der Kultur als auch mittels PCR *S. Typhimurium* positiv, während dieser Anteil nach Infektion mit *invC::aphT* nur 49 % betrug. Alle Tiere waren in Mandibularlymphknoten und im Colon positiv, während *S. Typhimurium* nur selten in Muskulatur und Leber nachzuweisen war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Infektionen mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium* zu einer schweren Erkrankung führen können. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass beide in dieser Arbeit verwendeten Mutanten weniger krankmachend sind. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Deletionen in den *sseD*- bzw. *invC*-Bereichen tatsächlich zu Veränderungen bestimmter Eigenschaften geführt haben, die Teil der Pathogenitätsmechanismen für das Schwein sind. Im Unterschied zur Maus war *sseD* beim Schwein allerdings invasiv. Es kann vermutet werden, dass die durch *sseD* kodierten Pathogenitätseigenschaften von *S. Typhimurium* bei der Maus anders als beim Schwein wirken und somit unterschiedliche Bedeutung haben. Da die *invC::aphT*-Mutante jedoch, und wie erwartet, wesentlich schwächer als Wildtyp und *sseD::aphT* invadierte, ist davon auszugehen, dass die Deletion im *invC* Bereich das Invasionsvermögen der Mutante beim Schwein ähnlich wie bei der Maus verringerte.

7 SUMMARY

Haukur Lindberg Sigmarsson

COMPARISON OF THE PATHOGENICITY OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM DT104 WILD TYPE AND *SALMONELLA* TYPHIMURIUM DELETIONSMUTANTS (*sseD::aphT* & *invC::aphT*) IN PERSISTENT INFECTED PIGS

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

Submitted February 2012

74 pages, 22 figures, 23 tables, 241 references, 14 pages appendices

Keywords: *Salmonella* Typhimurium DT104, deletion mutant, *invC* gene, *sseD* gene, swine, experimental infection

Salmonella (*S.*) Typhimurium DT104 is a gram-negative bacteria. It does not have a strong host specificity and is considered a zoonotic pathogen. In Germany, several thousand people get sick annually with the clinical picture of a severe diarrhea which occasionally can also lead to death. The pig is considered a reservoir for infections of humans. *S.* Typhimurium DT104 is transmitted to human through pig products that are offered for food consumption. The control of *S.* Typhimurium DT104 including effective measures for eradication in our pig industry is therefore crucial in the attempt to eliminate the entry of this bacteria into the human food chain. To achieve this goal it is necessary to understand *S.* Typhimurium DT104 including the mechanisms that regulates its pathogenicity. The aim of the present study was to investigate into pathogenic properties of *S.* Typhimurium DT104. For this reason the wild type was compared to two of its mutants (i.e. *sseD::aphT* und *invC::aphT*).

In this investigation, a total of 25 six weeks old male pigs were used for an infection trail. Animals were confined in a fully climatized pig barn. After being moved into the barn the pig were allowed to acclimatize for one week, and were then infected with *S.* Typhimurium DT104 orally in a concentration of 1×10^{11} cfu as follows: wild type (n = 8 pigs), mutant *sseD::aphT* (n = 8) as well as mutant *invC::aphT* (n = 9). The mutants are variants of

S. Typhimurium DT104 that have been modified at the respective loci of the bacterial genome (i.e. at the *sseD*-gene and *invC*-gene, respectively). While *sseD* is involved in regulating of the survival ability of *S. Typhimurium* in macrophages, *invC* regulates its ability to invade. Using the mouse model a reduced pathogenicity has been demonstrated for both mutants. The day after infection a 20-days observation period commenced and the following parameters were determined, or samples taken during that period: clinical symptoms (general health, vomiting, diarrhea, feed consumption, breathing, body temperature); white blood cell count; collection of faeces for the detection of *S. Typhimurium*. One day after the last day of the observation period all animals were sacrificed and specimens taken from a total of 15 organs that includes tonsils; colon and caecum as well as lymph nodes, respectively; liver; spleen; muscle). All faecal samples and tissue specimens were subjected to cultural analysis as well as PCR.

All animals that received the wild type of *S. Typhimurium* got more or less sick. Sick animals often had more than one clinical symptom at the same time (e.g. vomiting and diarrhea). The disease often lasted over several days. In comparison, animals that received either of the mutants were only slightly sick. Moreover, only a few animals were sick and the sickness then disappeared quickly. There was also usually only one clinical parameter that was affected. Typical changes of the white blood count was only observed in animals that were infected with the wild type, while animals that received either of the mutants did not show much as the result of infection. All 25 infected animals shed *S. Typhimurium* via faeces within the first week of infection. After this time animals of all three groups started to shed intermittently. Between 65 and 67 % of the animals that were infected with either the wild type of *S. Typhimurium* or the *sseD::aphT*-mutant were found positive for *S. Typhimurium* with both culture and PCR. In comparison, the percentage of specimens that were positive after infection with *invC::aphT* was 49 %. In all pigs *S. Typhimurium* was found in lymph nodes of the mandibular gland and in colon, while it was rarely observed in liver and muscle.

The results of this study confirm that, infections with the wild type of *S. Typhimurium* can lead to severe sickness. At the same time it could be demonstrated that, the mutants that were used in this study are less “sick-making”. It is assumed that, the modifications that occurred to the *sseD* and *invC* regions resulted in changes of certain properties that are part of the mechanisms that regulate the pathogenicity of the bacteria in pigs. In contrast to mice *sseD* has been shown to be invasive in the pig. It is assumed that, *sseD* codes for pathogenicity properties that act in a different manner in pigs than in mice and thus may have a different significance for the pig. However, the fact that the *invC::aphT* mutant did invade to a much slighter extent than *sseD::aphT* suggest that the modification that occurred at the *invC* region did reduce the invasion capability of that mutant.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sorensen PD, Olsen JE. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1993;7(3):171-8.

Agbor TA, McCormick BA. Salmonella Effectors: Important players modulating host cell function during infection. Cell Microbiol. 2011.

Akeda Y, Galan JE. Genetic analysis of the Salmonella enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. J Bacteriol. 2004;186(8):2402-12.

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(11):6446-52.

Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. Bacteriophage-typing designations of Salmonella typhimurium. J Hyg (Lond). 1977;78(2):297-300.

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

Anonymus. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. - Änderung 1 Anhang D: Nachweis von *Salmonella* spp. in Tierkot und in Proben aus Primärproduktion (ISO6579:2002/DAMd 1:2005). 2005. International Organization for Standardization.

Anonymus. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. (ISO 6579:2002+Amd 1:2007); Deutsche Fassung EN ISO 6579:2002+A1:2007. 2007. International Organization for Standardization.

Arnold T, Scholz HC, Marg H, Rosler 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 Infect Dis Vet Public Health. 2004;51(10):459-63.

Ashkenazi S, Cleary TG, Murray BE, Wanger A, Pickering LK. Quantitative analysis and partial characterization of cytotoxin production by Salmonella strains. Infect Immun. 1988;56(12):3089-94.

Bager F, Petersen J. Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of Salmonella from pigs. Acta Vet Scand. 1991;32(4):473-81.

Baggesen DL, Skov MN, Brown DJ, Bisgaard M. Separation of Salmonella typhimurium DT2 and DT135: molecular characterization of isolates of avian origin. Eur J Epidemiol. 1997;13(3):347-52.

Balaji R, Wright KJ, Hill CM, Dritz SS, Knoppel EL, Minton JE. Acute phase responses of pigs challenged orally with Salmonella typhimurium. J Anim Sci. 2000;78(7):1885-91.

- Berends BR, Urlings HA, Snijders JM, van KF. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs. *Int J Food Microbiol.* 1996;30(1-2):37-53.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Mastschweinen. Bericht des BfR vom 20. Februar 2008. Endbericht gemäß Entscheidung 2006/668/EG. 2008. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). 20-2-2008.
- Bhat P, Rajan D. Comparative evaluation of desoxycholate citrate medium and xylose lysine desoxycholate medium in the isolation of shigellae. *Am J Clin Pathol.* 1975;64(3):399-404.
- Botteldoorn N, Heyndrickx M, Rijpens N, Grijspeerdt K, Herman L. Salmonella on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):891-903.
- Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N. Rapid infection of pigs following exposure to environments contaminated with different levels of Salmonella typhimurium. *Foodborne Pathog Dis.* 2007;4(1):33-40.
- Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van IF, Ducatelle R, Pasmans F. Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol.* 2008;130(1-2):1-19.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2465-7.
- 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.
- Brumme S. Charakterisierung der Virulenzfaktoren *invC* und *sseD* des Typ III-Sekretionssystems von Salmonella Typhimurium DT104 mittels *ex vivo* Zytokin-Expression im experimentell infizierten Schwein [Dissertation med. vet.] Univ. Leipzig; 2006.
- CALLOW BR. A new phage-typing scheme for Salmonella typhi-murium. *J Hyg (Lond).* 1959;57:346-59.
- Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, Prasad R, Mekalanos JJ. Cloning and expression of the Salmonella enterotoxin gene. *J Bacteriol.* 1987;169(11):5095-100.
- Chopra AK, Huang JH, Xu X, Burden K, Niesel DW, Rosenbaum MW et al. Role of Salmonella enterotoxin in overall virulence of the organism. *Microb Pathog.* 1999;27(3):155-71.
- Clothier KA, Kinyon JM, Frana TS. Comparison of Salmonella serovar isolation and antimicrobial resistance patterns from porcine samples between 2003 and 2008. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22(4):578-82.
- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):112-8.

- Coe NE, Frank DE, Wood RL, Roth JA. Alteration of neutrophil function in BCG-treated and non-treated swine after exposure to *Salmonella typhimurium*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1992;33(1-2):37-50.
- Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J Bacteriol*. 1973;115(1):307-15.
- Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(3):405-28.
- Davies RH, Wray C. Use of antibody-coated cellulose sponges for enhanced isolation of salmonella. *Lett Appl Microbiol*. 1997;25(4):246-8.
- Dieck K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K-J, Weinke T. *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch*. Enke Verlag, Stuttgart; 1993.
- Dinjus U, Hanel I, Rabsch W, Helmuth R. Studies of the presence of the virulence factors, adhesion, invasion, intracellular multiplication and toxin formation in salmonellas of different origin. *Zentralbl Bakteriologie*. 1998;287(4):387-98.
- Dong T, Schellhorn HE. Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun*. 2010;78(3):887-97.
- Dorn C, Schroeter A, Helmuth R. Salmonellenvorkommen beim Schwein-epidemiologische Situation und Bewertung des Verbraucherschutzrisikos. *Prakt Tierarzt*. 2003;84(12):930-6.
- Dunn C, Martin WJ. Comparison of media for isolation of salmonellae and shigellae from fecal specimens. *Appl Microbiol*. 1971;22(1):17-22.
- D'Aoust JY. Update on Penrichment and Selective Enrichment Conditions for Detection of *Salmonella* in Foods. *J Food Prot*. 1981;44:369-74.
- Eder H. Blut und Lymphe. In: Wittke G, (Hrsg.). *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey; 1987: 160-207.
- Edfors-Lilja I, Wattrang E, Magnusson U, Fossum C. Genetic variation in parameters reflecting immune competence of swine. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994;40(1):1-16.
- EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to "Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pigproduction"¹. *The EFSA Journal*. 2006;341(2090):1-131.
- EFSA (European Food Safety Authority). Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007, Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *The EFSA Journal*. 2008;135:1-111.
- EFSA (European Food Safety Authority). SCIENTIFIC REPORT OF EFSA; Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008 Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *The EFSA Journal*. 2009;7(12)(1377).

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. The EFSA Journal. 2011;9(2090).

Eichelberg K, Ginocchio CC, Galan JE. Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the F0F1 ATPase family of proteins. J Bacteriol. 1994;176(15):4501-10.

Eigner U, Reissbrodt R, Hammann R, Fahr AM. Evaluation of a new chromogenic medium for the isolation and presumptive identification of *Salmonella* species from stool specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20(8):558-65.

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 Pt 2:927-30.

Falkow S. Infectious multiple drug resistance. London: Pion Limited; 1975.

Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. Int J Food Microbiol. 2003;85(1-2):63-71.

Fedoraka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. *Salmonella* Infection in Pigs. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. New York: CABI Publishing; 2000: 191-208.

Fedoraka-Cray PJ, Whipp SC, Isaacson RE, Nord N, Lager K. Transmission of *Salmonella typhimurium* to swine. Vet Microbiol. 1994;41(4):333-44.

Felix A, Callow BR. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. BMJ. 1943;127-30.

Fierer J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. J Clin Invest. 2001;107(7):775-80.

Fierer J, Krause M, Tauxe R, Guiney D. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. J Infect Dis. 1992;166(3):639-42.

Finlay BB. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 1994;192:163-85.

Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, Brenner FW, Fields PI. Molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. Appl Environ Microbiol. 2003;69(10):6099-105.

Fluit AC, Widjojoatmodjo MN, Verhoef J. Detection of *Salmonella* species in fecal samples by immunomagnetic separation and PCR. J Clin Microbiol. 1995;33(4):1046-7.

Friedrich A, Dorn C, Schroeter A, Szabo I, Jaber M, Berendonk G et al. [Report on *Salmonella* isolates in livestock, food and feed, received at the German national reference

- laboratory for Salmonella during 2004-2008]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2010;123(7-8):265-77.
- Friedrich A, Szabo I, Dorn C, Schroeter A, Jaber M, Berendonk G et al. [Report on Salmonella isolates received at the German National Reference Laboratory for Salmonella in the year 2009]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2011;124(9-10):401-10.
- Galan JE, Curtiss RI. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(16):6383-7.
- Galan JE, Curtiss RI. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of Salmonella typhimurium among other Salmonella serovars: *invA* mutants of Salmonella typhi are deficient for entry into mammalian cells. Infect Immun. 1991;59(9):2901-8.
- 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(13):4338-49.
- Galan JE, Miller VL, Portnoy D. Discussion of in vitro and in vivo assays for studying bacterial entry into and survival within eukaryotic cells. Infect Agents Dis. 1993;2(4):288-90.
- Gallois A, Klein JR, Allen LA, Jones BD, Nauseef WM. Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. J Immunol. 2001;166(9):5741-8.
- Gareis M. Salmonellae - A Survey. Fleischwirtsch. 1995;75(8):954-7.
- Gerlach RG, Hensel M. Salmonella pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of Salmonella enterica. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2007;120(7-8):317-27.
- Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL, Galan JE. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on Salmonella typhimurium. Cell. 1994;76(4):717-24.
- Grimont PAD, Weill FX. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, (Hrsg.). 9. 2007. Paris.
- Grimont P, Grimont F, BP. Taxonomy of the Genus Salmonella. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). Salmonella in Domestic Animals. New York: CABI Publishing; 2000: 1-17.
- Groisman EA, Ochman H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by Salmonella typhimurium and Shigella flexneri. EMBO J. 1993;12(10):3779-87.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PA et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2010;161(1):26-9.
- Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid Salmonella serovars. FEMS Microbiol Lett. 1994;124(1):1-9.

- Guiney DG, Fierer J. The Role of the *spv* Genes in Salmonella Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2011;2:129.
- Guthire RK. Control of *Salmonella* spread. *Salmonella*. Boca Raton, Ann Arbor, London: CRC Press; 1992: 63-80.
- Hallstrom K, McCormick BA. Salmonella Interaction with and Passage through the Intestinal Mucosa: Through the Lens of the Organism. *Front Microbiol.* 2011;2:88.
- Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to Salmonella virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;297(2):241-9.
- Hansen-Wester I, Hensel M. Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* 2001;3(7):549-59.
- Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M et al. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol.* 2005;174(3):1675-85.
- Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(1):53-66.
- Hartung M, Käsbohrer A. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009. 17-56. 2011. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).
- Heesemann J, Hensel M. Infektionsmodelle, Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Listerien. In: Heesemann J, Hacker J, (Hrsg.). *Molekulare Infektionsbiologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2000: 220-222.
- Helms M, Ethelberg S, Molbak K. International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(6):859-67.
- Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common Salmonella serotypes. *Infect Immun.* 1985;48(1):175-82.
- Hensel M. Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2000;36(5):1015-23.
- Hensel M, Shea JE, Gleeson C, Jones MD, Dalton E, Holden DW. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science.* 1995;269(5222):400-3.
- Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol.* 1998;30(1):163-74.
- Henzler DJ, Opitz HM. The role of mice in the epizootiology of Salmonella enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis.* 1992;36(3):625-31.

- Hof H, Dörries R, Müller RL. Mikrobiologie. Stuttgart, Germany: George Thieme Verlag; 2000.
- Holden DW. Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages. *Traffic*. 2002;3(3):161-9.
- Hollinger K. Epidemiology and Salmonellosis. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). *Salmonella in domestic animals*. New York: CABI Publishing; 2000: 341-353.
- Holzer SU, Hensel M. Functional dissection of translocon proteins of the Salmonella pathogenicity island 2-encoded type III secretion system. *BMC Microbiol*. 2010;10:104.
- Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH. Rapid infection in market-weight swine following exposure to a Salmonella typhimurium-contaminated environment. *Am J Vet Res*. 2001;62(8):1194-7.
- Hutchinson F, Donnellan J EJr. A general database for DNA sequence changes induced by mutagenesis of several bacterial and mammalian genes. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(1):172-6.
- INFOSAN (The International Foodsafety Authoritis Network). INFOSAN Information Note No 3 / 2005 - *Salmonella* - Antimicrobial-resitant *Salmonella*. 3. 2005.
- Isaacson RE, Firkins LD, Weigel RM, Zuckermann FA, DiPietro JA. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of Salmonella typhimurium among experimentally infected pigs. *Am J Vet Res*. 1999;60(9):1155-8.
- Karasova D, Sebkova A, Vrbas V, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Comparative analysis of Salmonella enterica serovar Enteritidis mutants with a vaccine potential. *Vaccine*. 2009;27(38):5265-70.
- Kauffmann F. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonella Bazillen. *Zeitschrift Hyg Infektionskrnk*. 1935;117:26-32.
- Kauffmann F. The species definition in the Enterobacteriaceae. *Int Bull Bacteriol Nomenclat Taxon*. 1961;11:5-6.
- Kauffmann F. Das *Salmonella* subgenus IV. *Ann Immunol Hungar*. 1966;9:77-80.
- Klein JR, Jones BD. Salmonella pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect Immun*. 2001;69(2):737-43.
- Klena JD, Pradel E, Schnaitman CA. Comparison of lipopolysaccharide biosynthesis genes rfaK, rfaL, rfaY, and rfaZ of Escherichia coli K-12 and Salmonella typhimurium. *J Bacteriol*. 1992;174(14):4746-52.
- Korsgaard H, Wegener HC, Helms M. [The societal cost of zoonotic Salmonella infections and other foodborne bacterial infections in Denmark]. *Ugeskr Laeger*. 2005;167(7):760-3.
- Kraczkiewicz-Dowjat A, Wolska KI, Kunicki-Goldfinger WJ. Mechanism of conjugation and recombination in bacteria. XXI. Role of F factor genes in post-conjugational recombination in Escherichia coli K-12. *Acta Microbiol Pol*. 1984;33(1):11-24.

- Kraft W, Dürr UM. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 6. Auflage. Stuttgart; New York: Schattauer; 2005.
- Krause G. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten. Berlin: Mercedes Druck; 2001.
- Kristensen M., Lester V., Jurgens A. Use of trypsinized casein, brom-thymol blue, brom-cresol-purple, phenol-red and brilliant green for bacteriological nutrient media. Br J Exp Pathol. 1925;6:291-9.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2-3):95-125.
- Kühn H, Tschäpe H. Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte. 3/95. Auflage. MMV Medizin Verlag München; 1995.
- Lan R, Reeves PR, Octavia S. Population structure, origins and evolution of major Salmonella enterica clones. Infect Genet Evol. 2009;9(5):996-1005.
- Larsen ST, McKean JD, Hurd HS, Rostagno MH, Griffith RW, Wesley IV. Impact of commercial preharvest transportation and holding on the prevalence of Salmonella enterica in cull sows. J Food Prot. 2003;66(7):1134-8.
- Le Minor L, Popoff MY. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. Rev., as the type and only species of the Genus *Salmonella*. Int J Syst Bacteriol. 1987;37:465-8.
- LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens. Science. 1996;274(5290):1208-11.
- Lederberg J, Tatum EL. Novel genotypes in mixed cultures of bichemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbour Symp Quant Biol. 1946;11:113.
- Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG. The Salmonella spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. Mol Microbiol. 2001;39(6):1464-70.
- Levy SB. The Antibiotic Paradox: How Miracle Drugs are Destroying the Miracle. New York: Plenum Press; 1992.
- Libby SJ, Adams LG, Ficht TA, Allen C, Whitford HA, Buchmeier NA et al. The spv genes on the Salmonella dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. Infect Immun. 1997;65(5):1786-92.
- Libby SJ, Goebel W, Ludwig A, Buchmeier N, Bowe F, Fang FC et al. A cytolysin encoded by Salmonella is required for survival within macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(2):489-93.
- Libby SJ, Goebel W, Muir S, Songer G, Heffron F. Cloning and characterization of a cytotoxin gene from Salmonella typhimurium. Res Microbiol. 1990;141(7-8):775-83.

- Liebeswar G, Allerberger F. Standardisierung und Qualitätssicherung in der mikrobiologischen Diagnostik-Richtlinien. Wien: Bundesministerium für Soziale Sicherheit und Generationen; 2001.
- Lindqvist L, Schweda KH, Reeves PR, Lindberg AA. In vitro synthesis of CDP-d-abequose using Salmonella enzymes of cloned rfb genes. Production of CDP-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose, CDP-3,6-dideoxy-D-xylo-4-hexulose and CDP-3,6-dideoxy-D-galactose, and isolation by HPLC. *Eur J Biochem.* 1994;225(3):863-72.
- Loströh CP, Lee CA. The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 2001;3(14-15):1281-91.
- Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL. Acute infection of swine by various Salmonella serovars. *J Food Prot.* 2004;67(7):1484-8.
- Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science.* 1993;259(5095):686-8.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clin Infect Dis.* 2010;50(6):882-9.
- Malik-Kale P, Jolly CE, Lathrop S, Winfree S, Luterbach C, Steele-Mortimer O. Salmonella - at home in the host cell. *Front Microbiol.* 2011;2:125.
- Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2000;2(2):145-56.
- Marg H, Scholz HC, Arnold T, Rosler U, Hensel A. Influence of long-time transportation stress on re-activation of Salmonella typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001;114(9-10):385-8.
- Martin G. Eigenschaften von Salmonellen und ihre Beziehungen zu Stimulierung von Immunreaktionen. *Mh Vet Med.* 1992;47:632-6.
- Mayr A, Rolle M. Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten. Stuttgart: Enke Verlag; 1993.
- Mazurkiewicz P, Thomas J, Thompson JA, Liu M, Arbibe L, Sansonetti P et al. SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol.* 2008;67(6):1371-83.
- McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V. Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol.* 2009;12(1):117-24.
- Medina E, Paglia P, Nikolaus T, Müller A, Hensel M, Guzman CA. Pathogenicity island 2 mutants of Salmonella typhimurium are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun.* 1999;67(3):1093-9.
- Meurens F, Berri M, Auray G, Melo S, Levast B, Virlogeux-Payant I et al. Early immune response following Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. *Vet Res.* 2009;40(1):5.

- Meyer H. [Animals as sources of infections in humans--salmonellosis]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1999;106(8):344-51.
- Meyer H, Steinbach G, Methner U. [Control of salmonella infections in animal herds--basis for a reduction of salmonella entries into food]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1993;100(7):292-5.
- Meyerholz DK, Stabel TJ, Ackermann MR, Carlson SA, Jones BD, Pohlenz J. Early epithelial invasion by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in the swine ileum. *Vet Pathol.* 2002;39(6):712-20.
- Mitov I, Denchev V, Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of *Salmonella typhimurium*: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine.* 1992;10(1):61-6.
- Morris A, Kellner JD, Low DE. The superbugs: evolution, dissemination and fitness. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1(5):524-9.
- Mueller M, Brandenburg K, Dedrick R, Schromm AB, Seydel U. Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein. *J Immunol.* 2005;174(2):1091-6.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1915-22.
- 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(3-4):205-18.
- Niewold TA, Veldhuizen EJ, van der MJ, Haagsman HP, de Wit AA, Smits MA et al. The early transcriptional response of pig small intestinal mucosa to invasion by *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Mol Immunol.* 2007;44(6):1316-22.
- Norte VA, Stapleton MR, Green J. PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium slyA gene. *J Bacteriol.* 2003;185(12):3508-14.
- Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(15):7800-4.
- Olsen JE, Aabo S, Nielsen EO, Nielsen BB. Isolation of a *Salmonella*-specific DNA hybridization probe. *APMIS.* 1991;99(2):114-20.
- Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3014-20.
- Pascopella L, Raupach B, Ghorri N, Monack D, Falkow S, Small PL. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun.* 1995;63(11):4329-35.

- Perron GG, Quessy S, Bell G. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. *PLoS One*. 2008;3(11):e3749.
- Perron GG, Quessy S, Letellier A, Bell G. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *Infect Genet Evol*. 2007;7(2):223-8.
- Pietzsch O. *Salmonella*. In: Blobel H, Schliesser T, (Hrsg.). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Jena: VEB Fischer Verlag; 1981.
- Popoff MY, Bockemuhl J, McWhorter-Murlin A. Supplement 1993 (no. 37) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*. 1994;145(9):711-6.
- Poppe C, Ziebell K, Martin L, Allen K. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella typhimurium* DT104 isolates. *Microb Drug Resist*. 2002;8(2):107-22.
- Porter SB, Tinge SA, Curtiss R, III. Virulence of *Salmonella typhimurium* mutants for White Leghorn chicks. *Avian Dis*. 1993;37(2):265-73.
- Prager R, Liesegang A, Rabsch W, Gericke B, Thiel W, Voigt W et al. Clonal relationship of *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT104 in Germany and Austria. *Zentralbl Bakteriol*. 1999;289(4):399-414.
- Prasad R, Chopra AK, Chary P, Peterson JW. Expression and characterization of the cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. *Microb Pathog*. 1992;13(2):109-21.
- Prasad R, Chopra AK, Peterson JW, Pericas R, Houston CW. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog*. 1990;9(5):315-29.
- Rabsch W, Tschape H, Baumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes Infect*. 2001;3(3):237-47.
- Rahman H, Streckel W, Prager R, Tschape H. Presence of *sopE* gene & its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* isolated from man & animals. *Indian J Med Res*. 2004;120(1):35-8.
- 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(4):271-9.
- RAPPAPORT F, KONFORTI N, NAVON B. A new enrichment medium for certain *Salmonellae*. *J Clin Pathol*. 1956;9(3):261-6.
- Rathnayaka RMUS. Evaluation of five DNA extraction methods in the detection of *Salmonella enterica* from meat using nested PCR. *JAS*; Vol 6, No 1 (2011). 2011.
- Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 1995;141 (Pt 12):3015-27.
- Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ, III. 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(2):313-20.

Reiner G, Hepp S, Holweger K. [Phenotypic and genetic variation in hematological traits of Pietrain-Meishan-F2 crossbred pigs]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2007;114(11):429-36.

Reitmeyer JC, Peterson JW, Wilson KJ. *Salmonella* cytotoxin: a component of the bacterial outer membrane. *Microb Pathog.* 1986;1(5):503-10.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992;267(2):54-61.

Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H et al. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology.* 1993;187(3-5):169-90.

RKI (Robert Koch-Institut). *Epidemiologisches Bulletin; Zur Situation bei ausgewählten meldepflichtigen Infektionskrankheiten im Jahr 1996: Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden).* 8, 49-53. 1997.

RKI (Robert Koch-Institut). *Epidemiologisches Bulletin; Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland: Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen.* 41, 351-362. 2006.

RKI (Robert Koch-Institut). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006.* Berlin: Robert Koch-Institut (RKI); 2007.

RKI (Robert Koch-Institut). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009.* Berlin: Robert Koch-Institut (RKI); 2010.

RKI (Robert Koch-Institut). *Epidemiologisches Bulletin; Meldepflichtige Infektionskrankheiten; Jahresstatistik 2010.* 14, 105-116. 2011a.

RKI (Robert Koch-Institut). *Epidemiologisches Bulletin; Salmonellose; Aus der Arbeit des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger.* 15, 125-136. 2011b.

RKI (Robert Koch-Institut). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010.* Berlin: Robert Koch-Institut (RKI); 2011c.

Robbins JB, Chu C, 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(2):346-61.

Robertsson JA, Lindberg AA, Hoiseth S, Stocker BA. *Salmonella typhimurium* infection in calves: protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines. *Infect Immun.* 1983;41(2):742-50.

Roesler U. *Charakterisierung der Porzinen Salmonella Typhimurium DT104-Infektion und Maßnahmen zur Salmonellen-Reduktion in Schweinemast- und Schweinezuchtbetrieben [Dissertation med. vet.]* Leipzig: Univ. Leipzig; 2007.

- 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(5):595-603.
- Rotger R, Casadesus J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol*. 1999;2(3):177-84.
- Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol*. 1995;3(2):129-34.
- Rycroft AN. Structure, Funktion and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. New York: CABI Publishing; 2000: 19-34.
- Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;305(1):1-13.
- Sander J. [Pathogenesis of salmonella infections in humans]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1993;100(7):283-5.
- Santos RL, Tsolis RM, Baumler AJ, Adams LG. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(1):3-12.
- Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1335-44.
- Saunders JR. Genetics and evolution of antibiotic resistance. *Br Med Bull*. 1984;40(1):54-60.
- Saxen H, Reima I, Makela PH. Alternative complement pathway activation by *Salmonella* O polysaccharide as a virulence determinant in the mouse. *Microb Pathog*. 1987;2(1):15-28.
- Scherer K, Szabo I, Rosler U, Appel B, Hensel A, Nockler 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(4):699-705.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. 1995;164(6):383-9.
- Schlundt J, Munch B. A comparison of the efficiency of Rappaport-Vassiliadis, tetrathionate and selenite broths with and without pre-enrichment for the isolation of *Salmonella* in animal waste biogas plants. *Zentralbl Bakteriol*. 1993;279(3):336-43.
- Schmieger H. Molecular survey of the *Salmonella* phage typing system of Anderson. *J Bacteriol*. 1999;181(5):1630-5.
- Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;170(1):251-6.
- Scholz HC, Arnold T, Marg H, Rosler U, Hensel A. Improvement of an invA-based PCR for the specific detection of *Salmonella typhimurium* in organs of pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2001;114(9-10):401-3.

- Selbitz HJ. Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Bakteriologie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena; 1992.
- Selbitz HJ. Adaption of *Salmonella* Strains to Their Host and Its Significance for Zoonosis. *Prakt Tierarzt*. 1993;74:1102.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayr A, (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 417-588.
- Selbitz H-J. Die Virulenz der *Salmonellen*-Faktoren und Mechanismen. *Prakt Tierarzt*. 1991;7:589-92.
- Selbitz H-J, Sinell H-J, Sziegoleit A. Taxonomie und Nomenklatur. *Das Salmonellen-Problem*. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1995: 17-19.
- Seydel U, Labischinski H, Kastowsky M, Brandenburg K. Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide. *Immunobiology*. 1993;187(3-5):191-211.
- Seydel U, Schromm AB, Brade L, Gronow S, Andra J, Muller M et al. Physicochemical characterization of carboxymethyl lipid A derivatives in relation to biological activity. *FEBS J*. 2005;272(2):327-40.
- Spector MP. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. *Adv Microb Physiol*. 1998;40:233-79.
- Stackbrandt E, R.G.E.Murray, H.Truper. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int J Syst Bacteriol*. 1988;38:321-5.
- Stecher B, Hapfelmeier S, Muller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun*. 2004;72(7):4138-50.
- Steinbach G, Kroell U. [Salmonella infections in swine herds--epidemiology and importance for human diseases]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 1999;106(7):282-8.
- Szabo I, Scherer K, Roesler U, Appel B, Nockler K, Hensel A. Comparative examination and validation of ELISA test systems for *Salmonella typhimurium* diagnosis of slaughtering pigs. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(1):65-9.
- Taylor WI. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *Am J Clin Pathol*. 1965;44(4):471-5.
- Tenover FC, Schaberg DR. Molecular biology of resistance. In: Bennett JV, Brachman PS, (Hrsg.). *Hospital Infections*. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven Publishers; 1998: 237-247.
- Threlfall EJ. Epidemic salmonella typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother*. 2000;46(1):7-10.
- Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M et al. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in

humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill.* 2003;8(2):41-5.

Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzeby JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(Pt 1):521-4.

Tinge SA, Curtiss RI. Isolation of the replication and partitioning regions of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid and stabilization of heterologous replicons. *J Bacteriol.* 1990;172(9):5266-77.

Touron A, Berthe T, Pawlak B, Petit F. Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay. *Res Microbiol.* 2005;156(4):541-53.

Tschäpe H, Bockemühl J. Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* 2002;45:491-6.

van Diemen PM, Kreukniet MB, Galina L, Bumstead N, Wallis TS. Characterisation of a resource population of pigs screened for resistance to salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;88(3-4):183-96.

Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F. Tissue-Specific *Salmonella Typhimurium* Gene Expression during Persistence in Pigs. *PLoS One.* 2011;6(8):e24120.

Vassiliadis P, Pateraki E, Papaiconomou N, Papadakis JA, Trichopoulos D. New Procedure of *Salmonella* Enrichment. *Ann Microb.* 1976;B127(2):195-200.

Venkatesan MM, Buysse JM, Oaks EV. Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the *spa* locus. *J Bacteriol.* 1992;174(6):1990-2001.

Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 2004;38 Suppl 3:S127-S134.

von Altrock A, Schütte A, Hildebrandt G. Untersuchungen aus Deutschland zu dem EU-Projekt "Salmonella in pork (Salinpork)-1.Mitteilung:Untersuchungen in den Beständen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2000;113:191-201.

Waage AS, Vardund T, Lund V, Kapperud G. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J Appl Microbiol.* 1999;87(3):418-28.

Wales AD, Cook AJ, Davies RH. Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Vet Rec.* 2011;168(10):267-76.

Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 2000;36(5):997-1005.

Waltman WD. Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In: Wray C, Wray A, (Hrsg.). *Salmonella in Domestic Animals*. New York: CABI Publishing; 2000: 355-372.

- Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* 2003;5(8):501-11.
- Watson PR, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS. Interaction of Salmonella serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology.* 2000;146 (Pt 7):1639-49.
- Wegener HC, Hald T, Lo Fo WD, Madsen M, Korsgaard H, Bager F et al. Salmonella control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):774-80.
- Werckenthin C, Schwarz S. [Resistance to protein biosynthesis inhibitors in Staphylococci: resistance genes and their spread--a review]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1997;110(9):324-32.
- Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. *BMJ.* 1999;318(7190):1046-50.
- WHO (World Health Organization). Drug-resistant Salmonella. WHO, (Hrsg.). Fact Sheet N°139, 1-5. 2005. Geneva, Food Safety Department WHO/Geneva. Media centre; Fact Sheets.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI, Verhoef J. Evaluation of the Magnetic Immuno Pcr Assay for Rapid Detection of Salmonella. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991;10(11):935-8.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GP, Verhoef J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 1992;30(12):3195-9.
- Wiesner E, Ribbeck R. Wörterbuch der Veterinärmedizin. 3. Auflage. Jena; Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991.
- Wilcock BP, Schwartz K. Salmonellosis. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WE, D'Allaire S, Taylor DJ, (Hrsg.). Diseases of Swine. Iowa: Iowa State University Press; 1992: 570-583.
- Williams JL, Minton JE, Patterson JA, Marchant FJ, Eicher SD. Lairage during transport of eighteen-kilogram pigs has an impact on innate immunity and commensal bacteria diversity in the intestines. *J Anim Sci.* 2008;86(5):1232-44.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J Bacteriol.* 1994;176(6):1561-9.
- Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res.* 1989;50(7):1015-21.
- Wood RL, Rose R. Populations of Salmonella typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. *Am J Vet Res.* 1992;53(5):653-8.
- Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of Salmonella in poultry. *Vaccine.* 1999;17(20-21):2538-45.

Zhao S, Fedorka-Cray PJ, Friedman S, McDermott PF, Walker RD, Qaiyumi S et al. Characterization of Salmonella Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Foodborne Pathog Dis. 2005;2(2):169-81.

Zhao S, McDermott PF, White DG, Qaiyumi S, Friedman SL, Abbott JW et al. Characterization of multidrug resistant Salmonella recovered from diseased animals. Vet Microbiol. 2007;123(1-3):122-32.

Zurawski DV, Stein MA. The SPI2-encoded SseA chaperone has discrete domains required for SseB stabilization and export, and binds within the C-terminus of SseB and SseD. Microbiology. 2004;150(Pt 7):2055-68.

9 ANHANG

Tabelle 7. Mittelwerte der Körpertemperatur (°C) der, mit dem *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, der Deletionsmutante-*invC::aphT*, der Deletionsmutante-*sseD::aphT* infizierten Schweine und die dazugehörige Standardabweichung

Mittelwerte der Körpertemperatur der infizierten Versuchsschweine in °C						
Tag nach der Infektion	DM- <i>invC::aphT</i>		DM- <i>sseD::aphT</i>		Wildtyp DT104	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
0	39,7	0,5	39,4	0,2	38,8	0,3
1	38,9	0,3	39,4	0,4	39,2	0,5
2	39,1	0,4	39,8	0,4	40	0,5
3	39,6	0,3	39,6	0,4	39,3	0,3
4	39,6	0,4	39,3	0,4	39,4	0,6
5	39,4	0,3	39,7	0,2	39,1	0,6
6	39,2	0,3	39,5	0,2	39,2	0,6
7	39,8	0,3	39,4	0,2	39,2	0,4
8	39,9	0,3	39,4	0,2	39,2	0,6
9	39,5	0,3	39,4	0,3	39,2	0,4
10	39,4	0,2	39,5	0,1	39,3	0,3

DM = Deletionsmutante

Tabelle 8. Mittelwerte des Körpergewichts der mit dem *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, der Deletionsmutante-*invC::aphT*, der Deletionsmutante-*sseD::aphT* infizierten Schweine mit der dazugehörigen Standardabweichung und Signifikanz

Mittelwerte für das Körpergewicht der infizierten Schweine in kg			
Tag	WT DT 104 n = 8 Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n = 9 Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n = 8 Mittelwert ± s
0	8,9 ± 1,3 ^d	10,3 ± 1,2 ^d	9,9 ± 1,1 ^d
3	9,0 ± 1,2 ^{B,d}	11,6 ± 1,5 ^{A,c,d}	nicht gemessen
7	9,6 ± 1,4 ^{B,d}	13,6 ± 1,8 ^{A,b,c}	10,9 ± 1,0 ^{B,c,d}
10	11,2 ± 1,5 ^{B,c,d}	14,7 ± 1,5 ^{A,b}	12,5 ± 1,9 ^{B,b,c}
14	13,0 ± 1,9 ^{B,b,c}	17,7 ± 1,8 ^{A,a}	14,0 ± 2,6 ^{B,b}
17	14,8 ± 2,1 ^{B,a,b}	19,2 ± 2,6 ^{A,a}	16,5 ± 1,8 ^{A,B,a}
21	16,8 ± 2,5 ^a	nicht gemessen	nicht gemessen

Am Tag 3 konnten die Gruppe DM-*sseD::aphT* und am Tag 21. die Gruppen DM-*sseD::aphT* und DM-*invC::aphT* aus technischen Gründen nicht gemessen werden.
 WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante
 A – B = Werte unterscheiden sich signifikant (P≤0,05) in Zeilen.
 a – d = Werte unterscheiden sich signifikant (P≤0,05) in Spalten.

Anhang

Tabelle 9. Klinischer Score des Allgemeinbefindens der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, Deletionsmutante *invC::aphT* und Deletionsmutante *sseD::aphT*

Klinischer Score für das Allgemeinbefinden					
Tag nach der Infektion	Deskriptive Statistik	WT DT104 (A)	DM- <i>invC::aphT</i> (B)	DM- <i>sseD::aphT</i> (C)	Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen
0	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert (± SD)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
	Standardabw.	0	0	0	A:C p=1,0
	min	0	0	0	
	max	0	0	0	B:C p= 1,0
1	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	0,125	
	Standardabw.	0	0	0,354	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	0	0	1	B:C p= 0,289
2	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,250	0	0	
	Standardabw.	0,707	0	0	A:C p= , 317
	min	0	0	0	
	max	2	0	0	B:C p= 1,0
3	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,125	0	0	
	Standardabw.	0,354	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	1	0	0	B:C p= 1,0
4	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	0	A:C p= 1,0
	min	0	0	0	
	max	0	0	0	B:C p= 1,0
5	n	8	9	8	A:B p= 0,05
	Mittelwert	0,250 ^a	0 ^b	0 ^b	
	Standardabw.	0,378	0	0	A:C p= 0,06
	min	0	0	0	
	max	1	0	0	B:C p= 1,0
6	n	8	9	8	A:B p= 0,121
	Mittelwert	0,125	0	0	
	Standardabw.	0,232	0	0	A:C p= 0,143
	min	0	0	0	
	max	0,5	0	0	B:C p= 1,0
7	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,063	0	0	
	Standardabw.	0,177	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	0,5	0	0	B:C p= 1,0
8 - 21	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	0	A:C p= 1,0
	min	0	0	0	
	max	0	0	0	B:C p= 1,0

WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante

Anhang

Tabelle 10. Klinischer Score des Durchfallerscheinens der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, Deletionsmutante *invC::aphT* und Deletionsmutante *sseD::aphT*

Klinischer Score für das Durchfallgeschehen					
Tag nach der Infektion	Deskriptive Statistik	WT DT104 (A)	DM- <i>invC::aphT</i> (B)	DM- <i>sseD::aphT</i> (C)	Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen
0	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	0	A:C p=1,0
	min	0	0	0	
	max	0	0	0	B:C p= 1,0
1	n	8	9	8	A:B p= 0,155
	Mittelwert	0,875	0,111	0	
	Standardabw.	1,246	0,333	0	A:C p= 0,064
	min	0	0	0	
	max	3	1	1	B:C p= 0,346
2	n	8	9	8	A:B p= 0,001
	Mittelwert	1,375	0	0	
	Standardabw.	1,060	0	0	A:C p= 0,001
	min	0	0	0	
	max	3	0	0	B:C p= 1,0
3	n	8	9	8	A:B p= 0,174
	Mittelwert	0,750	0	0,111	
	Standardabw.	1,165	0	0,333	A:C p= 0,064
	min	0	0	0	
	max	3	0	1	B:C p= 0,346
4	n	8	9	8	A:B p= 0,024
	Mittelwert	1,250	0,111	0,125	
	Standardabw.	1,280	0,333	0,354	A:C p= 0,034
	min	0	0	0	
	max	3	1	1	B:C p= 0,931
5	n	8	9	8	A:B p= 0,016
	Mittelwert	1,875	0,111	0	
	Standardabw.	1,553	0,333	0	A:C p= 0,009
	min	0	0	0	
	max	3	1	0	B:C p= 0,346
6	n	8	9	8	A:B p= 0,018
	Mittelwert	1,375	0,056	0	
	Standardabw.	1,302	0,167	0	A:C p= 0,010
	min	0	0	0	
	max	3,0	0,5	0	B:C p= 0,346
7	n	8	9	8	A:B p= 0,020
	Mittelwert	1,250	0,111	0	
	Standardabw.	1,165	0,333	0	A:C p= 0,010
	min	0	0	0	
	max	3,0	1	0	B:C p= 0,346
8	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,250	0	0	
	Standardabw.	0,707	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	2	0	0	B:C p= 1,0

WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante

Fortsetzung nächste Seite

Anhang

Tag nach der Infektion	Deskriptive Statistik	WT DT104 (A)	DM- invC::aphT (B)	DM- sseD::aphT (C)	Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen
9	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,125	0	0	
	Standardabw.	0,354	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	1	0	0	B:C p= 1,0
10	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,125	0	0,188	
	Standardabw.	0,354	0	0,530	A:C p= 0,927
	min	0	0	0	
	max	1	0	1,5	B:C p= 0,289
11	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,125	0	0	
	Standardabw.	0,354	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	1	0	0	B:C p= 1,0
12	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,063	0	0	
	Standardabw.	0,177	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	0,5	0	0	B:C p= 1,0
13	n	8	9	8	A:B p= 0,289
	Mittelwert	0,063	0	0	
	Standardabw.	0,177	0	0	A:C p= 0,317
	min	0	0	0	
	max	0,5	0	0	B:C p= 1,0
14	n	8	9	8	A:B p= 0,271
	Mittelwert	0,250	0,111	0	
	Standardabw.	0,378	0,333	0	A:C p= 0,064
	min	0	0	0	
	max	1	1	0	B:C p= 0,346
15	n	8	9	8	A:B p= 0,346
	Mittelwert	0	0,222	0	
	Standardabw.	0	0,667	0	A:C p= 1,0
	min	0	0	0	
	max	0	2	0	B:C p= 0,346
16 - 21	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	0	A:C p= 1,0
	min	0	0	0	
	max	0	0	0	B:C p= 1,0

WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante

Anhang

Tabelle 11. Die Mittelwerte der Gesamtleukozytenzahl ($10^3/\text{mm}^3$) der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert \pm s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert \pm s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert \pm s
0	8 8,0 \pm 2,1 ^{C,c}	9 16,1 \pm 3,1 ^A	8 13,9 \pm 2,7 ^{A,B,a,b,c}
3	8 15,3 \pm 3,5 ^{a,b}	8 19,7 \pm 5,8	8 19,5 \pm 4,0 ^a
7	8 18,1 \pm 4,0 ^{a,b}	9 20,7 \pm 5,5	8 15,2 \pm 3,9 ^{a,b}
10	8 20,1 \pm 5,1 ^a	9 20,3 \pm 7,4	8 15,3 \pm 2,8 ^{a,b}
14	8 17,6 \pm 3,9 ^{A,B,a,b}	9 25,6 \pm 10,4 ^A	8 12,0 \pm 2,3 ^{C,b,c}
17	8 15,7 \pm 0,8 ^{A,B,a,b}	9 22,8 \pm 8,2 ^A	8 12,9 \pm 3,0 ^{B,b,c}
21	8 14,6 \pm 1,3 ^b	6 14,4 \pm 7,4 ^{A,B}	7 9,9 \pm 2,6 ^{B,c}
A – C = Werte unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,05$) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant ($P \leq 0,05$) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 12. Die Mittelwerte der relativen Lymphozytenzahlen der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in Prozent

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert \pm s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert \pm s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert \pm s
0	8 66,8 \pm 15,7 ^{A,a}	9 47,4 \pm 15,3 ^{A,B,a,b}	8 43,0 \pm 14,5 ^{B,b}
3	8 47,3 \pm 14,7 ^b	8 36,9 \pm 12,7 ^b	8 45,4 \pm 12,2 ^b
7	8 35,0 \pm 8,9 ^{B,b}	9 60,8 \pm 16,6 ^{A,a}	8 42,6 \pm 10,4 ^{B,b}
10	8 36,8 \pm 10,1 ^b	9 54,0 \pm 14,1 ^{a,b}	8 48,1 \pm 17,5 ^b
14	8 37,8 \pm 8,0 ^b	9 50,1 \pm 19,0 ^b	8 48,4 \pm 17,8 ^{a,b}
17	8 47,5 \pm 9,0 ^{B,b}	9 56,1 \pm 11,9 ^{B,a,b}	8 71,9 \pm 7,5 ^{A,a}
21	8 48,4 \pm 5,7 ^{B,b}	6 46,2 \pm 15,3 ^{B,a,b}	7 71,7 \pm 13,5 ^{A,a}
A – C = Werte unterscheiden sich signifikant ($P \leq 0,05$) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant ($P \leq 0,05$) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Anhang

Tabelle 13. Die Mittelwerte der relativen Zahlen der neutrophilen stabkernigen Granulozyten der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in Prozent

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert ± s
0	8 0,9 ± 1,4 ^b	9 1,8 ± 1,3	8 1,8 ± 1,3 ^a
3	8 4,6 ± 3,0 ^{A,a}	8 1,9 ± 1,9 ^{A,B}	8 1,0 ± 0,9 ^{B,a,b}
7	8 1,1 ± 0,6 ^b	9 1,7 ± 2,5	8 0,5 ± 0,8 ^{a,b}
10	8 1,1 ± 0,6 ^b	9 2,2 ± 2,7	8 0,5 ± 1,1 ^{a,b}
14	8 1,5 ± 1,3 ^b	9 0,8 ± 0,8	8 1,3 ± 1,1 ^{a,b}
17	8 1,5 ± 1,2 ^b	9 1,8 ± 1,8	8 1,0 ± 0,9 ^{a,b}
21	8 2,3 ± 2,1 ^{a,b}	6 1,2 ± 1,2	7 0,1 ± 0,4 ^b
A – C = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 14. Die Mittelwerte der relativen Zahlen der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in Prozent

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert ± s
0	8 22,6 ± 13,8 ^{B,b}	9 45,0 ± 15,3 ^A	8 46,4 ± 12,5 ^{A,a}
3	8 40,5 ± 16,9 ^{a,b}	8 55,5 ± 9,7	8 49,1 ± 11,5 ^a
7	8 54,9 ± 11,7 ^{A,a}	9 33,8 ± 16,3 ^B	8 52,1 ± 8,8 ^{A,a}
10	8 54,0 ± 10,1 ^a	9 37,1 ± 15,5	8 46,8 ± 17,1 ^a
14	8 53,4 ± 7,8 ^a	9 45,4 ± 17,9	8 41,0 ± 14,2 ^{a,b}
17	8 41,4 ± 8,7 ^{A,a}	9 34,2 ± 11,4 ^{A,B}	8 23,6 ± 7,4 ^{B,b}
21	8 39,3 ± 7,0 ^{A,B,a,b}	6 47,7 ± 14,7 ^A	7 24,1 ± 12,4 ^{B,b}
A – C = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Anhang

Tabelle 15. Die Mittelwerte der relativen Zahlen der eosinophilen Granulozyten der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in Prozent

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert ± s
0	8 2,8 ± 2,3 ^{a,b}	9 1,2 ± 1,4	8 1,1 ± 1,0
3	8 0,75 ± 0,7 ^b	8 2,3 ± 1,5	8 1,3 ± 1,3
7	8 2,9 ± 2,0 ^{A,a,b}	9 0,6 ± 0,7 ^B	8 1,4 ± 1,1 ^{A,B}
10	8 1,6 ± 1,6 ^{a,b}	9 1,0 ± 0,9	8 1,5 ± 1,3
14	8 3,5 ± 1,4 ^{A,a}	9 0,9 ± 0,9 ^B	8 1,0 ± 1,2 ^B
17	8 2,3 ± 1,7 ^{A,a,b}	9 0,9 ± 1,6 ^{A,B}	8 0,4 ± 0,5 ^B
21	8 2,8 ± 1,8 ^{a,b}	6 2,3 ± 2,1	7 1,1 ± 1,4
A – C = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 16. Die Mittelwerte der relativen Monozytenzahlen der Infektionsgruppen, *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp, *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten in Prozent

Tag nach der Infektion	WT DT 104 n Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n Mittelwert ± s
0	8 6,75 ± 4,1	9 4,6 ± 1,3 ^{a,b}	8 7,5 ± 3,2 ^a
3	8 6,8 ± 3,6	8 3,5 ± 1,3 ^b	8 3,3 ± 1,4 ^b
7	8 6,0 ± 3,0	9 3,2 ± 1,8 ^b	8 3,4 ± 1,6 ^b
10	8 6,5 ± 3,2 ^A	9 5,4 ± 2,5 ^{A,B,a,b}	8 3,1 ± 1,5 ^{B,b}
14	8 3,5 ± 1,9	9 2,8 ± 1,9 ^b	8 5,3 ± 2,9 ^{a,b}
17	8 6,5 ± 3,6 ^{A,B}	9 6,9 ± 1,5 ^{A,a}	8 3,1 ± 1,5 ^{B,b}
21	8 6,75 ± 3,4 ^A	6 2,7 ± 2,7 ^{B,b}	7 2,7 ± 1,6 ^{B,b}
A – C = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Zeilen a – c = Werte unterscheiden sich Signifikant (P≤0,05) in Spalten WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 17. Qualitativer Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 in Faeces

Qualitativer Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Faeces			
Tag nach der Infektion	Wildtyp DT104 n = 8 n (%)	DM- <i>invC::aphT</i> n = 9 n (%)	DM- <i>sseD::aphT</i> n = 8 n (%)
0	0	0	0
3	8 (100)	9 (100)	8 (100)
7	5 (63)	8 (89)	8 (100)
10	8 (100)	8 (89)	8 (100)
14	5 (63)	9 (100)	7 (88)
17	8 (100)	6 (67)	6 (75)
21	8 (100)	5 (56)	7 (88)
WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 18. Qualitativer Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 in untersuchten Organ- und Gewebeproben

Qualitativer Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Organ- und Gewebeproben			
	WT DT104 n = 8 n (%)	DM- <i>invC::aphT</i> n = 9 n (%)	DM- <i>sseD::aphT</i> n = 8 n (%)
Tonsille	8 (100)	8 (89)	8 (100)
Mandibular-Lnn.	8 (100)	9 (100)	8 (100)
Lungengewebe	5 (63) ^A	1 (11) ^B	3 (38) ^{A,B}
Lungen-Lnn.	4 (50)	1 (11)	4 (50)
Lebergewebe	2 (25)	0	2 (25)
Milzgewebe	0	0	1 (13)
Jejunalgewebe	5 (63) ^A	1 (11) ^B	6 (75) ^A
Ilealgewebe	8 (100)	5 (56)	8 (100)
Colongewebe	8 (100)	9 (100)	8 (100)
Caecumgewebe	8 (100)	8 (89)	7 (88)
Jejunal-Lnn.	4 (50)	5 (56)	7 (88)
Ileocaecal-Lnn.	8 (100)	7 (78)	8 (100)
Colon-Lnn.	7 (88)	6 (67)	8 (100)
Muskelgewebe	2 (25)	2 (22)	1 (13)
Gallenflüssigkeit	0	0	0
A – B = Werte unterscheiden sich signifikant (P≤0,05) in Zeilen. Lnn. = Lymphknoten, WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante			

Tabelle 19. Quantitativer Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-Infektionsstämme in untersuchten Organ- und Gewebeprobe

Nachweisrate von <i>S. Typhimurium</i> im Gewebe [KbE/g]			
Gewebe	WT DT104 n = 8 Mittelwert ± s	DM- <i>invC::aphT</i> n = 9 Mittelwert ± s	DM- <i>sseD::aphT</i> n = 8 Mittelwert ± s
To	5,07E+05 ± 8,70E+05 ^A	5,53E+04 ± 7,04E+04 ^B	1,53E+06 ± 2,88E+06 ^A
MaLy	0 ^A	0 ^B	1,00E+02 ± 1,00E+02 ^A
Je	0	0	3,33E+01 ± 6,17E+01
IL	1,78E+03 ± 4,68E+03	0	1,02E+04 ± 2,88E+04
Co	2,33E+02 ± 4,82E+02	1,48E+02 ± 4,44E+02	3,33E+01 ± 9,43E+01
Ca	2,33E+02 ± 4,82E+02	3,87E+02 ± 7,66E+02	8,41E+02 ± 2,11E+03
JeLy	0 ^B	0 ^B	5,12E+02 ± 8,13E+02 ^A
IcLy	1,67E+01 ± 4,71E+01 ^B	1,78E+02 ± 5,33E+02 ^B	8,15E+02 ± 6,18E+02 ^A
CoLy	0	1,48E+01 ± 4,44E+01	5,00E+01 ± 6,90E+01

A –B = Werte unterscheiden sich signifikant (P≤0,05) in Zeilen
 To = Tonsille; MaLy = Mandibularlymphknoten; Je = Jejunalgewebe; IL = Ilealgewebe; Co = Kolongewebe;
 Ca = Zäkumgewebe; JeLy = Jejunallymphknoten; IcLy = Ileozäkallymphknoten; CoLy = Kolonlymphknoten,
 WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante Bei den nicht aufgeführten Gewebeprobe aus dem
 Probespektrum konnte kein Nachweis erfolgen.

Anhang

Tabelle 20. Quantitativer Nachweis der *S. Typhimurium* DT104-Infektionsstämme in Organ- und Gewebeproben mit der dazugehörigen deskriptiven Statistik und Signifikanzprüfung

Nachweisrate von <i>S. Typhimurium</i> im Gewebe [KbE/g]					
Gewebe	Deskriptive Statistik	WT DT104 (A)	DM- <i>invC::aphT</i> (B)	DM- <i>sseD::aphT</i> (C)	Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen
To	n	8	9	8	A:B p= 0,136
	Mittelwert	5,07E+05	5,53E+04	1,53E+06	
	Median	1,86E+05	2,79E+04	3,81E+05	
	Standardabw.	8,70E+05	7,04E+04	2,88E+06	A:C p= 0,529
	min	0	0	3,64E+02	
	max	2,56E+06	1,81E+05	8,48E+06	B:C p= 0,034
	25	1,65E+04	2,00E+02	4,48E+04	
Perzentile	50	1,86E+05	2,79E+04	3,81E+05	
	75	6,77E+05	1,12E+05	1,51E+06	
MaLy	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	1,00E+02	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	1,85E+02	A:C p= 0,064
	min	0	0	5,33E+02	
	max	0	0	0	B:C p= 0,050
	25	0	0	0	
Perzentile	50	0	0	0	
	75	0	0	1,33E+02	
Je	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	3,33E+01	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	0	0	6,17E+01	A:C p= 0,143
	min	0	0	0	
	max	0	0	1,33E+02	B:C p= 0,121
	25	0	0	0	
Perzentile	50	0	0	0	
	75	0	0	1,00E+02	
IL	n	8	9	8	A:B p= 0,122
	Mittelwert	1,78E+03	0	1,02E+04	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	4,68E+03	0	2,88E+04	A:C p= 0,644
	min	0	0	0	
	max	1,33E+04	0	8,13E+04	B:C p= 0,289
	25	0	0	0	
Perzentile	50	0	0	0	
	75	7,00E+02	0	0	
Co	n	8	9	8	A:B p= 0,514
	Mittelwert	2,33E+02	1,48E+02	3,33E+01	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	4,82E+02	4,44E+02	9,43E+01	A:C p= 0,441
	min	0	0	0	
	max	1,33E+03	1,33E+03	2,67E+02	B:C p= 1,0
	25	0	0	0	
Perzentile	50	0	0	0	
	75	4,00E+02	0	0	

Fortsetzung nächste Seite

Anhang

Gewebe	Deskriptive Statistik	WT DT104 (A)	DM- <i>invC::aphT</i> (B)	DM- <i>sseD::aphT</i> (C)	Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen
Ca	n	8	9	8	A:B p= 0,720
	Mittelwert	2,33E+02	3,87E+02	8,41E+02	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	4,82E+02	7,66E+02	2,11E+03	A:C p= 0,469
	min	0	0	0	
	max	1,33E+03	2,13E+03	6,06E+03	
	Perzentile	25	0	0	0
50		0	0	6,67E+01	
75		4,00E+02	6,73E+02	3,33E+02	
JeLy	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	0	0	5,12E+02	
	Median	0	0	6,67E+01	
	Standardabw.	0	0	8,13E+02	A:C p= 0,027
	min	0	0	0	
	max	0	0	2,30E+03	
	Perzentile	25	0	0	0
50		0	0	6,67E+01	
75		0	0	8,82E+02	
IcLy	n	8	9	8	A:B p= 1,0
	Mittelwert	1,67E+01	1,78E+02	8,15E+02	
	Median	0,00	0	5,64E+02	
	Standardabw.	4,71E+01	5,33E+02	6,81E+02	A:C p= 0,001
	min	0	0	1,33E+02	
	max	1,33E+02	1,60E+03	1,94E+03	
	Perzentile	25	0	0	2,67E+02
50		0	0	5,64E+02	
75		0	0	1,48E+03	
CoLy	n	8	9	8	A:B p= 0,346
	Mittelwert	0	1,48E+01	5,00E+01	
	Median	0	0	0	
	Standardabw.	0	4,44E+01	6,90E+01	A:C p= 0,063
	min	0	0	0	
	max	0	1,33E+02	1,33E+02	
	Perzentile	25	0	0	0
50		0	0	0	
75		0	0	1,33E+02	

To = Tonsille; MaLy = Mandibularlymphknoten; Je = Jejunalgewebe; IL = Ilealgewebe; Co = Kolongewebe; Ca = Zäkumgewebe; JeLy = Jejunallymphknoten; IcLy = Ileozäkallymphknoten; CoLy = Kolonlymphknoten, WT DT104 = Wildtyp, DM = Deletionsmutante

Tabelle 21. Positiver Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp in untersuchten Organ- und Gewebeproben

Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104- Wildtyp in Organ- und Gewebeproben		
	Kulturelle Untersuchungen	PCR-Untersuchungen
	n (%)	n (%)
Tonsille	8 (100)	8 (100)
Mandibular-Lnn.	8 (100)	8 (100)
Lungengewebe	5 (63)	5 (63)
Lungen-Lnn.	4 (50)	4 (50)
Lebergewebe	2 (25)	2 (25)
Milzgewebe	0	0
Jejunalgewebe	5 (63)	5 (63)
Ilealgewebe	8 (100)	8 (100)
Colongewebe	8 (100)	8 (100)
Caecumgewebe	8 (100)	8 (100)
Jejunal-Lnn.	4 (50)	4 (50)
Ileocaecal-Lnn.	8 (100)	8 (100)
Colon-Lnn.	7 (88)	7 (88)
Muskelgewebe	2 (25)	2 (25)
Gallenflüssigkeit	0	0

Positiver Befund für jeweiliges Verfahren. Lnn. = Lymphknoten

Tabelle 22. Positiver Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT*-Mutante in untersuchten Organ- und Gewebeproben

Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 <i>invC::aphT</i> -Mutante in Organ- und Gewebeproben		
	Kulturelle Untersuchung	PCR-Untersuchung
	n (%)	n (%)
Tonsille	8 (89)	8 (89)
Mandibular-Lnn.	9 (100)	9 (100)
Lungengewebe	1 (11)	1 (11)
Lungen-Lnn.	1 (11)	1 (11)
Lebergewebe	0	0
Milzgewebe	0	0
Jejunalgewebe	1 (11)	1 (11)
Ilealgewebe	5 (56)	5 (56)
Colongewebe	9 (100)	9 (100)
Caecumgewebe	8 (89)	8 (89)
Jejunal-Lnn.	5 (56)	5 (56)
Ileocaecal-Lnn.	7 (78)	7 (78)
Colon-Lnn.	6 (67)	6 (67)
Muskelgewebe	2 (22)	2 (22)
Gallenflüssigkeit	0	0

Positiver Befund für jeweiliges Verfahren. Lnn. = Lymphknoten

Tabelle 23. Positiver Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 *sseD::aphT*-Mutante in untersuchten Organ- und Gewebeproben

Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 <i>sseD::aphT</i> -Mutante in Organ- und Gewebeproben		
	Kulturelle Untersuchung	PCR-Untersuchung
	n (%)	n (%)
Tonsille	8 (100)	8 (100)
Mandibular-Lnn.	8 (100)	8 (100)
Lungengewebe	3 (38)	3 (38)
Lungen-Lnn.	4 (50)	4 (50)
Lebergewebe	2 (25)	2 (25)
Milzgewebe	1 (13)	1 (13)
Jejunalgewebe	6 (75)	6 (75)
Ilealgewebe	8 (100)	8 (100)
Colongewebe	8 (100)	8 (100)
Caecumgewebe	7 (88)	7 (88)
Jejunal-Lnn.	7 (88)	7 (88)
Ileocaecal-Lnn.	8 (100)	8 (100)
Colon-Lnn.	8 (100)	8 (100)
Muskelgewebe	1 (13)	1 (13)
Gallenflüssigkeit	0	0

Positiver Befund für jeweiliges Verfahren. Lnn. = Lymphknoten

10 DANKSAGUNG

Im Anschluss an meine Arbeit möchte ich all jenen, die mit Worten und Taten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Insbesondere danke ich:

- Herrn Prof. Dr. Dr. A. Hensel für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, für seine Betreuung und für die fachliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. U. Rösler möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und für die fachliche Hilfe jeglicher kritischer Phasen der Laborarbeit bzw. Auswertung, sowie für die freundliche Begleitung der Arbeit bedanken.
- Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. U. Truyen für die Unterstützung während meiner Zeit am Institut.
- Herrn Prof. Dr. A. Sobiraj für die Unterstützung und für das entgegengebrachte Vertrauen.
- Dr. T. Arnold für die Beantwortung aller offenen Fragen rund um die PCR und die stets gewährte freundschaftliche Unterstützung.
- Dr. T. Herold für die stets aufmunternde Worte und die ständige Unterstützung in allen Bereichen.
- Allen an den Infektionsversuchen beteiligten Doktoranden des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, bestehend aus: Peter Burger, Steffi Brumme, Eugénie Zeeuw, Steffi Mauer, Melanie Hassel und Katharina Monig.
- Evelin Brumme und Nadja Leinecker für die tatkräftige und stets gewährte Hilfe im Labor.
- Allen Angehörigen des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für die ständige Unterstützung jeglicher Art.
- Familie Kauffold für die Freundschaft, die großartige Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die stets gewährte Hilfe.
- Reinhard Willig und Lydia Hildebrandt für die Freundschaft und die Unterstützung jeglicher Art.
- Meinen Eltern und meiner Freundin Almut Prkno für ihre unermüdliche Geduld und allseits gewährte Unterstützung.
- Allen anderen ungenannten Personen, die mit Worten und Taten zum Gelingen dieser Arbeit geholfen haben.