

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

**VERGLEICHENDE EVALUIERUNG DER IN
DEUTSCHLAND ZUGELASSENEN
ELISA-TESTSYSTEME ZUR *INTRA VITAM* UND
POST MORTEM DIAGNOSTIK DER PORZINEN
SALMONELLA INFANTIS INFEKTION**

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

eingereicht von
Claudia Matthies
aus Ruhland

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Professor Dr. Uwe Rösler

Gutachter

1.Gutachter: Professor Dr. Uwe Rösler
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig,
An den Tierkliniken 1,
04103 Leipzig

2.Gutachter: Professor Dr. Karsten Fehlhaber
Institut für Lebensmittelhygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig,
An den Tierkliniken 1,
04103 Leipzig

3.Gutachter: Dr. Karsten Nöckler
Bundesinstitut für Risikobewertung
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin

Tag der Verteidigung: 27.01.2009

Für meine Eltern

LITERATURÜBERSICHT

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Eigenschaften des Genus <i>Salmonella</i>	3
2.1.1	Taxonomie	3
2.1.2	Morphologische und biochemische Eigenschaften	4
2.1.3	Antigene Eigenschaften	4
2.1.4	Pathogenität und Virulenzfaktoren	5
2.1.5	Tenazität, Temperaturtoleranz und geographische Verbreitung	6
2.2	Diagnostik des Genus <i>Salmonella</i>	7
2.2.1	Kulturelle Diagnostik	7
2.2.2	Serologische Diagnostik	10
2.2.2.1	Objektträgerschnellagglutination	10
2.2.2.2	ELISA	10
2.2.2.2.1	ELISA-Technik	10
2.2.2.2.2	ELISA-Testsysteme	13
2.2.3	Molekularbiologische Diagnostik	14
2.2.3.1	DNA-Hybridisierung	14
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion	15
2.3	Epidemiologie des Genus <i>Salmonella</i>	16
2.3.1	Salmonelleninfektionen des Menschen	17
2.3.2	Salmonelleninfektionen des Schweines	19
2.3.2.1	primäre Salmonelleninfektionen	20
2.3.2.2	sekundäre Salmonelleninfektionen	21
2.3.2.3	Ausscheidungsmuster	21
2.3.2.4	Prävalenz in Deutschland	22
2.3.2.5	Risikofaktoren für das Auftreten von Salmonelleninfektionen in Schweinebeständen	23

2.4	Salmonellenmonitoringprogramme.....	24
2.4.1	Dänisches Salmonellenüberwachungsprogramm.....	24
2.4.1	Deutschland.....	26
2.4.2.1	QS - Programm.....	27
2.4.2.2	Schweine-Salmonellen-Verordnung.....	29
3	Tiere, Material und Methoden.....	31
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	31
3.2	Studienablauf.....	31
3.3	Tiere, Material und Methoden.....	32
3.3.1	Aufstallung der Tiere.....	32
3.3.2	Experimentelle Infektion mit <i>S. Infantis</i>	33
3.3.3	Probengewinnung.....	34
3.3.3.1	Technik der Kotprobenentnahme.....	34
3.3.3.2	Blutprobenentnahme.....	34
3.3.3.3	Organprobenentnahme.....	34
3.3.4	Diagnostik von <i>Salmonella</i> spp.	34
3.3.4.1	Qualitativer Salmonellennachweis in Faeces und Organen.....	34
3.3.4.2	Quantitativer Salmonellennachweis in Faeces und Organen.....	36
3.3.4.3	Serologische Diagnostik.....	37
3.4	Statistische Auswertung.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Klinik.....	39
4.2	<i>Salmonella</i>-Diagnostik.....	41
4.2.1	Bakteriologische Diagnostik.....	41
4.2.1.1	Quantitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Faecesproben.....	41
4.2.1.2	Qualitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Faecesproben.....	42
4.2.1.3	Quantitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Organ- und Gewebeproben....	44
4.2.1.4	Qualitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Organ- und Gewebeproben.....	45

4.2.2	Serologischer Nachweis nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion.....	46
4.2.2.1	Vergleich des Antikörpertiterverlaufs der Isotypen IgM, IgA und IgG mittels Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA.....	46
4.2.2.2	Vergleichender isotypenspezifischer Titerverlauf der ELISA-Systeme Salmotype [®] PigScreen [™] , HerdChek [®] Swine Salmonella [™] und Enterisol [®] Salmonellen-Diagnostikum [™]	50
4.2.2.3	Vergleich des Antikörpertiterverlaufes mit allen vier Testsystemen in Endserum und Fleischsaft.....	51
4.2.2.4	Sensitivitäten der einzelnen ELISA-Testsysteme.....	53
4.2.2.4.1	Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA.....	53
4.2.2.4.1.1	Sensitivitäten der einzelnen Isotypen.....	53
4.2.2.4.1.2	Sensitivitäten der einzelnen Isotypen im Vergleich.....	57
4.2.2.4.2	Salmotype [®] PigScreen [™]	61
4.2.2.4.2.1	Alle infizierten Tiere.....	61
4.2.2.4.2.2	Ausscheider von <i>S. Infantis</i> mit den Faezes.....	61
4.2.2.4.3	HerdChek [®] Swine Salmonella [™]	63
4.2.2.4.3.1	Alle infizierten Tiere.....	63
4.2.2.4.3.2	Ausscheider von <i>S. Infantis</i> mit den Faezes.....	63
4.2.2.4.4	Enterisol [®] Salmonellen-Diagnostikum [™]	65
4.2.2.4.4.1	Alle infizierten Tiere.....	65
4.2.2.4.4.2	Ausscheider von <i>S. Infantis</i> mit den Faezes.....	65
4.2.2.5	Sensitivitäten der vier getesteten ELISA-Systeme im Vergleich.....	67
4.2.2.5.1	Sensitivitäten nach Test-Cutoff.....	67
4.2.2.5.2	Sensitivitäten nach QS-Cutoff.....	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Klinik nach <i>S. Infantis</i> Infektion beim Schwein.....	74
5.2	Kulturelle Diagnostik von <i>S. Infantis</i>.....	75
5.2.1	Ausscheidung von <i>S. Infantis</i> mit den Faeces.....	75
5.2.2	Qualitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Gewebe- und Organproben.....	76
5.3	Serologischer Nachweis von <i>S. Infantis</i>.....	77
5.3.1	Verlauf Antikörpertiter während des Untersuchungszeitraumes.....	77
5.3.1.1	Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA.....	78
5.3.1.2	LPS-ELISA.....	81

5.4 Sensitivitäten der untersuchten ELISA-Systeme bei experimenteller	
S. Infantis Infektion.....	82
5.4.1 Der Einfluss des Cutoff-Wertes auf die Sensitivität.....	83
5.4.2 Vergleich des Antikörpertiters und der Sensitivität der einzelnen ELISA-Systeme in Endserum und Fleischsaft.....	85
5.4.3 Serologische und bakteriologische Diagnostik im Vergleich.....	86
6 Zusammenfassung.....	89
7 Summary.....	91
8 Literaturverzeichnis.....	93
Danksagung.....	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BfVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BPLS	Brilliantgrün-Phenol-Rot-Sucrose Agarmedium
bzw	beziehungsweise
ca	circa
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Enterisol [®]	Enterisol [®] Salmonella [™]
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU	Elisa - Unit
Fa.	Firma
FISH	Fluoreszenz- <i>In-situ</i> -Hybridisierung
h	Stunden
H-Ag	H-Antigene
HerdChek [®]	HerdChek [®] Swine Salmonella [™]
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
ISO	International Organisation of Standardisation
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LDL	Labor-Diagnostik-Leipzig
LFGB	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharid
LT	hitzelabile Form
min	Minute
ml	Milliliter

MRSV	modifiziertes halbfestes Rappaport-Vassiliadis-Medium
NRL-Salm	Nationales Referenzlabor für Salmonellen
O-Ag	O-Antigene
OD%	optische Dichte in Prozent
OMP	Outer membrane protein
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Polysaccharid
<i>p.inf.</i>	<i>post infectionem</i>
QS	Qualität und Sicherheit GmbH
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RV-Medium	Rappaport-Vassiliadis-Medium
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>S. Tm.</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
PigScreen™	Salmotype® PigScreen™
ser	Serovar
sp.	Spezies
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
spv	<i>Salmonella</i> plasmid virulence
ST	hitzestabile Form
spp.	Subspezies
s. S.	siehe Seite
TSeuchG	Tierseuchengesetz
u.a.	unter anderem
WCE	whole cell ELISA
WCE-ELISA	Salmotype® Pig STm-WCE™
XLD-Agarmedium	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agarmedium
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	Mikroliter

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Stichprobenschlüssel zur Untersuchung der Schweinebestände auf Salmonellen nach Schweine-Salmonellen-Verordnung.....	30
Tabelle 2. Einteilung der untersuchten Betriebe in Belastungskategorien nach Schweine-Salmonellen-Verordnung.....	30
Tabelle 3. Untersuchte Organ- und Gewebeproben nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion beim Schwein.....	36
Tabelle 4. Sensitivitäten aller getesteten ELISA-Systeme für Test-Cutoff und QS-Cutoff im Vergleich nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion beim Schwein.....	67
Tabelle 5. Sensitivitäten aller getesteten ELISA-Systeme für Test-Cutoff und QS-Cutoff in Endserum und Fleischsaft im Vergleich nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion.....	67

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Einteilung des Genus <i>Salmonella</i> in Spezies und Subspezies	3
Abbildung 2. Anteil verschiedener <i>Salmonella</i> -Serovare an den im Jahr 2005 durch das NRL- <i>Salmonella</i> (BfR) vom Schwein isolierten <i>Salmonella</i> -Isolaten	20
Abbildung 3. Infektion eines Schweins mit <i>Salmonella</i> Infantis.....	33
Abbildung 4. Quantitative Keimzahlbestimmung von <i>S. Infantis</i>	37
Abbildung 5. Mittlerer klinischer Score in den ersten 14 Tagen nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion.....	39
Abbildung 6. Verlauf des Durchfallgeschehens nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion.	40
Abbildung 7. Kotkonsistenz zwei Tage <i>p.i.</i> nach experimenteller <i>S. Infantis</i> Infektion.....	41
Abbildung 8. Quantitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in den Faeces experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierter Schweine (Mittelwerte).....	42
Abbildung 9. Ausscheidungsrate von <i>S. Infantis</i> im Kot experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierter Tiere über dem gesamten Versuchszeitraum.....	43
Abbildung 10. Quantitativer Nachweis von <i>S. Infantis</i> in Organen und Geweben experimentell infizierter Schweine.....	44
Abbildung 11. Nachweisrate von <i>S. Infantis</i> in Gewebeproben experimentell infizierter Schweine.....	45

-
- Abbildung 12. Isotypspezifische Antikörperaktivitäten im Blutserum experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] 48
- Abbildung 13. Vergleich der Antikörperantworten im Blutserum experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine anhand der drei in Deutschland für die Salmonellendiagnostik zugelassenen LPS-ELISA-Systeme..... 49
- Abbildung 14. Vergleich der Antikörperantworten im Endserum und im Fleischsaft experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine mittels dem isotypspezifischen Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA und den drei in Deutschland zugelassenen LPS-ELISA..... 52
- Abbildung 15. Sensitivitäten für den Isotyp IgM mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierten Tiere..... 54
- Abbildung 16. Sensitivitäten für den Isotyp IgM mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA aller Tiere, welche am jeweiligen Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden..... 54
- Abbildung 17. Sensitivitäten für den Isotyp IgA mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierten Tiere..... 56
- Abbildung 18. Sensitivitäten für den Isotyp IgA mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA aller Tiere, welche am jeweiligen Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden..... 56
- Abbildung 19. Sensitivitäten für den Isotyp IgG mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierten Tiere..... 58

Abbildung 20. Sensitivitäten für den Isotyp IgG mittels Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA aller Tiere welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden.....	58
Abbildung 21. Sensitivitäten der einzelnen Isotypen (IgM, IgA, IgG) des Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA für alle experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierten Tiere im Vergleich.....	59
Abbildung 22. Sensitivitäten der einzelnen Isotypen (IgM, IgA, IgG) des Salmotype [®] Pig STM-WCE [™] ELISA für alle Tiere im Vergleich, welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden.....	60
Abbildung 23. Sensitivitäten des Salmotype [®] PigScreen [™] aller experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierten Tiere.....	62
Abbildung 24. Sensitivitäten des Salmotype [®] PigScreen [™] aller Tier, welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden	62
Abbildung 25. Sensitivitäten des HerdChek [®] Swine Salmonella [™] aller experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierten Tiere.....	64
Abbildung 26. Sensitivitäten des HerdChek [®] Swine Salmonella [™] aller Tiere, welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden.....	64
Abbildung 27. Sensitivitäten des Enterisol [®] Salmonellen-Diagnostikum [™] aller experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierten Tiere.....	66
Abbildung 28. Sensitivitäten des Enterisol [®] Salmonellen-Diagnostikum [™] aller Tiere, welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden.....	66
Abbildung 29. Sensitivitäten nach Test-Cutoff aller Tests im Vergleich für alle experimentell mit <i>S. Infantis</i> infizierten Tiere.....	70

Abbildung 30. Sensitivitäten nach QS-Cutoff aller Tests im Vergleich für alle Tiere, welche am jeweiligen Tag <i>S. Infantis</i> mit den Faezes ausschieden.....	71
Abbildung 31. Vergleich der Ergebnisse der bakteriologischen und serologischen Nachweisrate der experimentellen <i>S. Infantis</i> Infektion an den jeweiligen Untersuchungstagen.....	88

1 Einleitung

Die Salmonellose des Menschen zählt weltweit zu den am häufigsten vorkommenden Zoonosen (DORN et al. 2003). Auch in Deutschland kommt der Salmonellose eine große sozialökonomische Bedeutung zu, da es sich um die zweithäufigste, durch Bakterien hervorgerufene, Lebensmittelinfektion handelt. Schätzungen gehen davon aus, dass insgesamt ca. 1 Million Menschen jährlich an der Salmonellose in Deutschland erkranken (SELBITZ 2006). Von der Gattung *Salmonella* sind weltweit über 2000 Serovare bekannt, von denen 50 als anerkannte Salmonelloseverursacher bei Menschen und Tieren gelten. *Salmonella* (*S.*) *Infantis* wurde in Deutschland bei 2 % der Lebensmittel-assoziierten Salmonellen-Isolate gefunden und gilt damit nach *S. Typhimurium* und *S. Derby* zu den wichtigsten Verursachern der Salmonellose. Dabei reichen die Krankheitsbilder von einer mild verlaufenden, selbstlimitierenden Diarrhoe bis zu schweren systemischen Infektionen. Die maßgeblichen Übertragungs- und Infektionsquellen sind kontaminiertes Wasser und kontaminierte Lebensmittel, von denen ca. 20 % vom Schwein ausgehen. Diese Fakten verdeutlichen die Notwendigkeit einer effektiven Salmonellenbekämpfung. Diese kann jedoch nicht allein in den Händen des Verbrauchers und dessen Umgang mit Lebensmitteln liegen, sondern muss zunehmend auf der ersten Stufe der Nahrungsmittelproduktion, in den landwirtschaftlichen Betrieben, erfolgen. Dazu wurden inzwischen auf nationaler und europäischer Ebene die gesetzlichen Grundlagen geschaffen und werden derzeit noch weiter erarbeitet. Dabei spielt der serologische Nachweis von Salmonelleninfektionen von Schweinen auf dem Schlachthof oder im Bestand eine entscheidende Rolle. Ziel der serologischen Diagnostik soll jedoch nicht das Erkennen einer Salmonelleninfektionen bei Einzeltieren sein, sondern vielmehr eine Einteilung des gesamten Bestandes in Salmonellenbelastungskategorien. Dies hat je nach Kategorie unterschiedliche hygienische Maßnahmen im Betrieb zur Folge oder eine gesonderte Behandlung eines zum Beispiel (z.B.) hoch belasteten Bestandes auf dem Schlachthof. In Deutschland existieren derzeit vier nach §17c des Tierseuchengesetzes (TSeuchG) zugelassene Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Testsysteme zur serologischen Diagnostik von Salmonelleninfektionen beim Schwein. In den gesetzlichen Grundlagen existiert jedoch keine Vorschrift, welcher Bestand welchen der vier Tests zu nutzen hat, bzw. welcher Test für die im Betrieb vorrangig vorkommende *Salmonella*-Serovar am besten geeignet ist. Somit ergibt sich das Ziel dieser Arbeit in der vergleichenden

Evaluierung dieser vier ELISA-Testsysteme zur serologischen Diagnostik von *S. Infantis* beim Schwein. Hierzu wurde das Serum von mit *S. Infantis* infizierten Schweinen im Untersuchungszeitraum von 123 Tagen mehrmals serologisch untersucht und ebenso der Fleischsaft. Es sollte zum einem die Fragestellung geklärt werden, ob alle in Deutschland, nach §17c TSeuchG, zugelassenen ELISA-Systeme in der Lage sind, die *S. Infantis* Infektion serologisch im Blut nachzuweisen. Zum anderen sollte untersucht werden, welcher dieser Tests am ehesten für eine Diagnostik einer *S. Infantis* Infektion geeignet ist. Dabei spielt der für die einzelnen ELISA-Systeme anzuwendende Cutoff-Wert eine entscheidende Rolle. Somit ergab sich die weitere Fragestellung, ob ein und derselbe Bestand, durch die vier verschiedenen Testsysteme, unter Anwendung der testinternen Cutoff-Werte, und des nach Schweine-Salmonellen-Verordnung einzusetzenden Cutoff-Wertes, in die gleiche Kategorie eingestuft wird, oder ob sich dabei gravierende Unterschiede mit Folgen für den Betrieb ergeben.

2 Literaturübersicht

2.1 Eigenschaften des Genus *Salmonella*

2.1.1 Taxonomie

Die Bezeichnung *Salmonella* wurde 1900 von Lignieres für den 1885 in den USA unter Leitung von Salmon beschriebenen Hogcholera-Bacillus (*Salmonella cholerasuis*) vorgeschlagen (SELBITZ 2006). Salmonellen gehören dabei zu den wichtigsten Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae*. Das Genus *Salmonella* besteht nach DNA-Analysen aus nur zwei Spezies: *Salmonella enterica* mit den sieben Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*, VII und *Salmonella bongori* (POPOFF et al., 2004).

In der Subspezies *enterica* vereinen sich alle Serovare, die für den Menschen und homoitherme Tiere eine Bedeutung haben (CLARKE und GYLES, 1993).

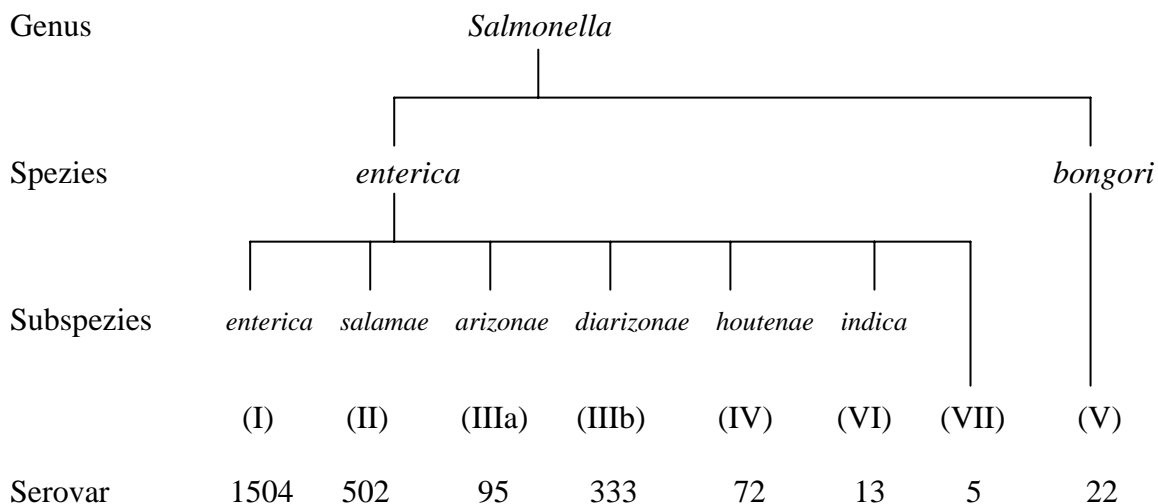


Abbildung 1. Einteilung des Genus *Salmonella* in Spezies und Subspezies
(POPOFF et al. 2004)

Durch die rasch anwachsende Zahl von neu entdeckten Salmonellen wurde zuerst von White und dann von Kauffmann ein neues Schema zur Einordnung der Salmonellen entwickelt. Dieses basierte auf den spezifischen O- und H-Antigenen von Salmonellen. Das Kauffmann-White-Schema bildet die international verbindliche Grundlage für die Ordnung der

Salmonellen. Es wird vom WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella am Pariser Pasteur-Institut regelmäßig aktualisiert (SELBITZ 2006).

Im Kauffmann-White-Schema sind derzeit 2541 Serovare definiert, welche meist aus Vertebraten isoliert wurden (POPOFF et al. 2004). Ursprünglich wurden für neue Serovare Eigennamen gebildet. Jetzt ist es üblich, nur noch für die Serovare von *Salmonella enterica* spp. *enterica* eigene Namen zu verwenden. Im Interesse einer übersichtlichen Schreibweise wird in der Regel nur der Gattungsname *Salmonella*, gefolgt von der Serovarenbezeichnung, beginnend mit einem Großbuchstaben, verwendet, das heißt (d.h.) *S. Typhimurium* anstelle der eigentlich korrekten Bezeichnung *S. enterica* spp. *enterica* ser. Typhimurium. Für alle übrigen Serovare werden die Antigenformeln angegeben (SELBITZ 2006).

2.1.2 Morphologische und biochemische Eigenschaften

Salmonellen stellen sich als gramnegative, sporenlose, meist bewegliche, peritrich begeißelte Kurzstäbchen mit einer Größe von 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm dar (BISPING und AMTSBERG 1988; DEDIÈ et al. 1993; SELBITZ 2006). Sie wachsen dabei unter aeroben, sowie fakultativ anaeroben Bedingungen (NICOLET 1985). Die biochemischen Eigenschaften der Salmonellen äußern sich in der Unfähigkeit, Laktose zu spalten, in der Bildung von Schwefelwasserstoff, dem Abbau von Propylenglykol und der Säurebildung, sowie der Fermentation von Glucuronat (LE MINOR 1984; HAHN et al. 1994; SELBITZ 2006).

2.1.3 Antigene Eigenschaften

Serologisch lassen sich Salmonellen in somatische (O)-Antigene, Geißel (H)-Antigene, Kapsel (K)-Antigene und Fimbrien (F)-Antigene unterteilen. Nach dem Kaufmann-White-Schema werden die Salmonellen dabei nach den vorherrschenden O-Antigenen (O-Ag) in O-Gruppen unterteilt, welche zusammen mit den Geißelantigenen die serovarspezifische Antigenformel bilden (DEDIÈ et al. 1993). Bei den O-Antigenen handelt es sich um formalinunbeständige, thermolabile Lipopolysaccharid-Komplexe in der bakteriellen Zellwand, wobei der Träger der serologischen Spezifität die Polysaccharid-Komponente ist. Die O-Antigene werden mit arabischen Ziffern bezeichnet. Serovaren mit gemeinsamen Haupt-O-Ag gehören zu Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet werden.

Die so genannten Minor-O-Ag kommen dagegen bei mehreren Gruppen vor. Die säureempfindlichen H-Antigene (H-Ag), welche durch Hitzestabilität und Formalinunempfindlichkeit gekennzeichnet sind, bestehen aus Proteinen, deren Aminosäuresequenz die Spezifität dieser Antigene bestimmt (BISPING und AMTSBERG 1988). H-Ag liegen häufig in zwei Phasen vor, wobei die Kultur eines diphasischen Serovar sowohl aus Zellen mit der ersten als auch Zellen mit der zweiten H-Phase besteht. Die einzelne Zelle exprimiert aber jeweils nur H-Ag einer Phase. Die Zuordnung der Isolate zum jeweiligen Serovar erfolgt dann abschließend anhand des gültigen Kauffmann-White-Schemas. Bei den menschenpathogenen Serovaren *S. Typhi* und *S. Paratyphi* ist ein zusätzliches V_i-Antigen vorhanden, welches als Kapselantigen der Zellwand aufgelagert ist. Es besitzt eine eigene serologische Aktivität und kann die O-Agglutination stören (SELBITZ 2006).

2.1.4 Pathogenität und Virulenzfaktoren

Die Pathogenität von Salmonellen wird maßgeblich durch die Faktoren Adhäsivität, Invasivität, fakultativ intrazellulärer Parasitismus, Toxinbildung (Endo-, Cyto-, Enterotoxine) und Adhäsion von Salmonellenzellen an das Darmepithel durch Beteiligung der Fimbrien bestimmt. Pathogenetisch notwendig für intrazelluläres Überleben ist die Expression von speziellen Oberflächenproteinen (SELBITZ 2006). Wichtige Genorte der Virulenz sind *spv*-Region (salmonella plasmid virulence) und die chromosomalen Pathogenitätsinseln (SPI-salmonella pathogenicity islands). Dabei wird SPI-1 von den Salmonellen zur Invasion der Darmepithelzellen und SPI-2 zur Kontrolle des eigenen intrazellulären Wachstums benötigt (BOYEN et al. 2004). Die Virulenz beruht auf der Wirkung eines Endotoxins – der Lipopolysaccharid (LPS)-Komponente. Für die Pathogenität ist der vollständige LPS-Komplex nötig. LPS besteht aus dem hydrophoben Lipid A Teil und dem hydrophilen Polysaccharidteil (PS). Der PS-Teil unterteilt sich in eine konstante Kern-Region, die bei allen *Enterobacteriaceae* ähnlich ist, und in den variablen O-Ag Teil, der spezifisch für die Serotypen ist (HOLST et al. 1998; RIETSCHER et al. 1994). Der lipophile Teil ist in der äußeren Membran verankert, während der immunreaktive PS-Teil dem Immunsystem ausgesetzt ist und so mit diesem interagiert (WESTPHAL et al. 1983). Grundsätzlich gelten alle Stämme als pathogen, jedoch bestehen große Unterschiede, welche unter anderem (u.a.) mit der

Adaptation an den Wirt zusammenhängen. Des Weiteren wird von einer Beteiligung eines Enterotoxins ausgegangen, welches eine Flüssigkeitsansammlung im Darm verursacht.

Salmonellen sind letztlich ebenso in der Lage die Synthese von Prostaglandinen zu aktivieren, welche zur Synthese von Adenylatzyklase und somit zur Bildung von zyklischen Adenosinmonophosphat (AMP) führen (NICOLET 1985).

2.1.5 Tenazität, Temperaturtoleranz und Geographische Verbreitung

Salmonellen sind weltweit verbreitet. Ihr Vorkommen ist dabei von der Lebensweise der Menschen, der Haltung und Fütterung der Haustiere, sowie von der Lebensmittel- und Umwelthygiene in verschiedenen Gebieten abhängig. Die Verbreitung ubiquitärer Salmonellen ist in Ländern mit mangelhafter öffentlicher Hygiene, in wärmeren Klimazonen und während der warmen Jahreszeiten größer. Durch Massentierhaltung und Verwendung von Importrohstoffen zur Futtermittelherstellung wurden Salmonellen auch in Ländern mit gutem Hygienestandard zum Problem.

Salmonellen vermehren sich ab Temperaturen von +5 °C bis +9 °C, wobei die Obergrenze der Wachstumsfähigkeit bei ubiquitären Salmonellen bei 43 - 47°C liegt. Durch spezielle Resistenzmechanismen ist es Salmonellen möglich, in kühlen und vor Sonnenlicht geschützten Substraten, Monate bis Jahre zu überleben. Sind bestimmte Voraussetzungen, wie Feuchtigkeit, Wärme und Verfügbarkeit von Nährstoffen gegeben, führt dies zu einer exzessiven Vermehrung des Erregers (PIETZSCH et al. 1981). Die Überlebensdauer in Abwasser beträgt 11 - 23 Tage, in Klärschlamm jedoch bis 6 und in Belebtschlamm tanks bis 11 Monate. Sonnenlicht inaktiviert Salmonellen binnen 10 Tagen; eingetrocknet in Dung oder Faezes und vor Licht geschützt, überleben sie jedoch bis 39 Tage. Auch trockene Nahrungsmittel ermöglichen ein Überleben über Monate (DEDIÈ et al. 1993). Alle Salmonellen können in Wasser, Schlamm, Dung, Staub, im Erdboden, vor allem aber auch angetrocknet an Gegenstände jeder Art, längere Zeit überleben und sich bei genügender Feuchtigkeit, ausreichendem Nährstoffgehalt, geeigneten Temperaturen und pH-Bereichen auch vermehren (BOES et al. 2005; BÖHM 1993; JENSEN et al. 2006; PIETZSCH 1981). Für Tierkot und Gülle werden in Abhängigkeit von der Temperatur 3 Monate bis 3 Jahre, für Flüssigmist 1 Jahr und für den Erdboden bis etwa 1 Jahr als Überlebenszeit genannt. Dagegen werden die Salmonellen innerhalb von Minuten durch Temperaturen über 70 °C, Sonnenlicht

oder gebräuchliche Desinfektionsmittel (auf der Basis von Phenolen, Chlor oder Jod), sofern sie nicht durch einhüllende Stoffe geschützt sind, abgetötet. Ebenso wird ihre Lebensdauer bei pH-Werten unter 5 stark verkürzt (KOCH 2002; SCHWARTZ 1999).

2.2 Diagnostik des Genus *Salmonella*

In jedem Salmonellenüberwachungsprogramm spielt die Diagnostik eine entscheidende Rolle. Als optimal stellt sich ein Verfahren dar, welches durch hohe Spezifität und Sensitivität, leichte und schnelle Durchführbarkeit, geringe Kosten und das Untersuchen mehrerer Proben gleichzeitig gekennzeichnet ist (NIELSEN und BAGGESEN 1997). Mit der serologischen Untersuchung ist es möglich, auch latente Träger zu erkennen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Antikörpern höher, als die des direkten Erregernachweises in Kot oder Lymphknoten infizierter Tiere (STEINBACH et al. 2002). Dennoch besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausscheidungsrate von Salmonellen in Kotproben und der Seroprävalenz im Bestand, so STEGE et al. (1997) bei dem Versuch einer experimentellen Infektion mit *S. Typhimurium*. Auch BAUM et al. (1998) zeigten, dass Tiergruppen mit hohen Salmonellennachweisraten in Kot und Lymphknoten durch ELISA - Tests ebenso als *Salmonella*-positiv identifiziert wurden. In Untersuchungen von SIBLEY et al. (2003) konnten mittels ELISA-Technik nur die Hälfte der Salmonellenausscheider identifiziert werden.

Die amtliche Untersuchung von Lebensmitteln auf Salmonellen erfolgt in Deutschland nach dem Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). Die darin vorgeschriebenen Untersuchungen wiederum basieren auf der Norm 6579:2007 der International Organisation for Standardisation (ISO) (ANONYMUS 2007). Die tierseuchenrechtliche Untersuchung von Schweinen erfolgt hingegen gemäß Schweine-Salmonellen-Verordnung durch eine serologische Untersuchung zum Schlachtzeitpunkt.

2.2.1 Kulturelle Diagnostik

Bis heute sind für den kulturellen Nachweis von Salmonellen eine große Anzahl von Methoden beschrieben (ANDREWS 1996; BUSSE 1995). Es existieren jedoch große Unterschiede in der Nachweisrate von *Salmonella* spp. zwischen verschiedenen Laboratorien und den jeweils gewählten Methoden. Dies zeigten umfassende Untersuchungen in Europa

und Amerika (WALTMAN und MALLINSON 1995). Mittels der kulturellen Diagnostik wird bei der Bestimmung der *Salmonella*-Isolate durch Nutzung weiterführender Untersuchungen (Sero-, Phagen- und Genotypisierung) eine Spezifität von 100% erreicht. Nachteile sind die immer noch geringe Sensitivität, hohe Kosten und die Arbeitsintensivität (FUNK 2003).

Zur Diagnostik werden in der Regel Kot- oder Organproben benutzt. FUNK et al. (1997) und HURD et al. (2003) stellten fest, dass mit steigender Probengröße die Sensitivität des Nachweises von Salmonellen im Schweinekot ansteigt. Je nach dem zu untersuchenden Material (Organe, Kot, Futter) ist die Isolierung von Salmonellen unterschiedlich. Es ist mit einer jeweils unterschiedlichen Begleitflora zu rechnen, welche das Wachstum der Salmonellen stark beeinflussen kann (VOOGT et al. 2002; NIELSEN und BAGGESEN 1997). Ein direkter Ausstrich ist zudem nur in der akuten Phase einer Salmonelleninfektion sinnvoll.

Seit Jahrzehnten erfolgt die gleiche Herangehensweise zum bakteriologischen Nachweis von Salmonellen. Zunächst erfolgt eine nicht-selektive Voranreicherung, welcher sich eine selektive Voranreicherung anschließt. Im Folgenden werden die Salmonellen auf selektiven festen Agarmedien ausgestrichen. Anschließend erfolgt die biochemische und serologische Identifikation der Isolate durch Genotypisierung, Phagotypisierung oder Serotypisierung. Die nicht selektive Voranreicherung dient zum Nachweis sehr geringer Salmonellenmengen oder subletal geschädigter Keime und hat somit einen positiven Einfluss auf die Isolierungsrate der Salmonellen (HOORFAR und BAGGESEN 1998; SCHLUNDT und MUNCH 1993). Man verwendet 1%iges phosphatgepuffertes Peptonwasser, bei welchem es sich um eine nährstoffreiche und hemmstofffreie Bouillon handelt, die ein intensives Wachstum und eine hohe Wiederbelebungsrate von subletal geschädigten Salmonellen zur Folge hat. Durch den Phosphatpuffer werden zudem negativ wirkende pH-Wert Schwankungen ausgeglichen (PIETZSCH 1981). Die Voranreicherungsflüssigkeit wird mit 10% des Volumens an gut zerkleinertem Material beimpft und 12-24 h bei 37 °C bebrütet. (DEDIÈ et al. 1993). Salmonellen sind im Vergleich zur Begleitflora meist nur in geringen Mengen im zu untersuchenden Material vorhanden. Dies führte zur Entwicklung verschiedener Selektivnährmedien, durch welche die Begleitflora in ihrer Vermehrung gehemmt wird. So stellen sich Selenit-Bouillon, Rappaport-Vassiliadis-Medien (RV), Selenit-Brilliantgrün-Bouillon, Tetrathionat-Bouillon, Tetrathionat-Brilliantgrün-Bouillon oder Hanja Tetrathionat-Bouillon als toxisch für die Begleitflora dar (NIELSEN und BAGGESEN 1997). Im Jahr 1956 wurde erstmalig von RAPPAPORT et al. (1956) ein Selektivmedium für Salmonellen beschrieben. Dieses modifizierte VASSILIADIS et al. (1976) zweimal, indem sie den Gehalt

an Malachit-Grün reduzierten, was eine Inkubation bei 42 °C ermöglichte. Aufgrund einer Hemmung von *Proteus* spp. eignet sich das RV-Medium besonders für die Untersuchung von tierischen Lebensmitteln, tierischen fäkalem Material und Abwasser (DEDIÈ et al. 1993). Als bewährte Anreicherungsmedien stellen sich ebenso Selenit-Bouillon und Tetrathionat-Bouillon nach Müller-Kaufmann oder Preuss dar. Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass das RV-Medium diesen überlegen ist. Dies geschieht vor allem durch den Gehalt an Malachitgrün, gegen das Salmonellen resistent sind (BAGER und PETERSEN 1991; SCHLUNDT und MUNCH 1993). Um die hohe Spezifität und Sensitivität nicht herabzusetzen, ist eine Inokulation im Verhältnis von 1:100 nötig. Seit einiger Zeit wird versucht, die selektive Voranreicherung mittels modifizierten halbfesten Rappaport-Vassiliadis-Mediums (MRSV) durchzuführen (JENSEN et al. 2003; PERALES und ERKIAGA 1991; WIBERG und NORBERG 1996). Das Nachweisprinzip basiert auf der Beweglichkeit von Salmonellen, die in das halbfeste Nährmedium eindringen und um die Inokulationsstelle eine Schwärmzone bilden. Die Beweglichkeit der anderen Mikroorganismen wird durch die selektiven Wirkstoffe (Magnesiumchlorid, Malachitgrün und Novobiocin) und die erhöhte Bebrütungstemperatur von 42°C weitgehend gehemmt. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität wurde das MRSV-Medium inzwischen bereits in den Anhang D der ISO 6579:2007 zum Nachweis von Salmonellen aus Kot- und Umwelt-Proben aufgenommen (ANONYMUS 2007). Nach 24h Bebrütungsdauer werden die Anreicherungskulturen auf Selektivnährböden ausgestrichen. Durch die ISO-Norm 6579:2007 wird ein paralleler Ausstrich auf Xylose-Lysine-Desoxycholat-Agarmedium (XLD-Agar) und einem weiteren frei zu wählenden festen Selektivmedium gefordert, von denen eine Vielzahl (z.B. Brilliantgrün-Phenol-Rot-Sucrose Agarmedium [BPLS]) inzwischen für die Salmonellendiagnostik entwickelt wurde. Durch XLD-Agar, welcher von TAYLOR (1965) entwickelt wurde, werden *Enterobacteriaceae*, v.a. die Spezies *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. differenziert und isoliert. Coliforme Keime werden hingegen durch den Zusatz von Natriumdesoxycholat gehemmt. Die Nährböden zeigen durch Farbumschlag (Vergärung von Laktose, Saccharose u.a.) oder durch Schwärzung (Sulfide) salmonellenverdächtige Kolonien an. Als Indikatorsysteme wirken Xylose, Laktose, Saccharose und Lysin mit Phenolrot zusammen. Der Wirkungsmechanismus des XLD-Agar beruht auf dem Abbau von Xylose, Laktose und Saccharose zu Säure (Umschlag des Phenolrots nach Gelb), auf der Decarboxylierung von Lysin zu Kadaverin (purpurrote Färbung um die Kolonien infolge der pH-Wert-Verschiebung hin zum alkalischen Bereich) und der Schwefelwasserstoff-Bildung aus Thiosulfat und Eisen (III)-Salzen unter Ausfällung von Eisensulfid, wodurch es zu einer

Schwärzung der Kolonien kommt. Durch Salmonellen wird die Xylose vollständig abgebaut und das Lysin decarboxyliert, wodurch der pH-Wert ansteigt und es zu einer zentralen Schwärzung der Kolonien kommt. Nachteilig wirken sich falsch positive Befunde, bei denen es sich um *Proteus* spp. handelt oder falsch negative Befunde aus, welche durch nicht schwefelbildende Salmonellen zustande kommen. KRISTENSEN et al. (1925) entwickelten 1925 einen weiteren häufig genutzten Selektivnährboden, den BPLS-Agar. 1935 wurde dieser von KAUFFMANN (1935) modifiziert. Die Selektivität basiert auf dem Vorhandensein von Brilliantgrün, sowie Laktose und Saccharose. Salmonellen erscheinen als rosarote Kolonien mit rotem Hof, da sie Laktose- und Saccharose- negativ sind, während Lactose- bzw. Saccharose-positive Keime (z.B. *E. coli*) gelbgrüne Kolonien bilden. Das Brilliantgrün verhindert dabei weitgehend das Wachstum von Begleitkeimen.

2.2.2 Serologische Diagnostik

2.2.2.1 Objektträgerschnellagglutination

Die bei der selektiven Anreicherung isolierten verdächtigen Kolonien können durch die Objektträgerschnellagglutination vorläufig identifiziert werden (DEDIÈ et al. 1993). Dazu werden diagnostische Seren verwendet. Dabei verreibt man eine kleine Öse Kulturmaterial in einem Tropfen des gebrauchsfertig verdünnten Serums, beobachtet unter langsamem Schwenken des Objektträgers bis zu zwei Minuten und protokolliert die bis dahin eingetretene körnige (O-) oder flockige (H-) Agglutination nach Stärke und Schnelligkeit. Einzelkolonien von Erst- oder Subkulturen werden mit einem polyvalenten O-Serum und, bei positiven Ausfall, mit gruppenspezifischen Seren untersucht. Die Zuordnung der Isolate zum jeweiligen Serovar erfolgt dann abschließend anhand des gültigen Kauffmann-White-Schemas. Spontanagglutinationen sind durch Kontrolle mit Kochsalzlösung (3,5%) auszuschließen.

2.2.2.2 ELISA

2.2.2.2.1 ELISA-Technik

Die ELISA-Technik basiert auf dem Nachweis von *Salmonella*-Antikörpern, bei dem immunologische und enzymatische Reaktionen kombiniert werden. Salmonellen führen durch oberflächenspezifische Antigene (LPS Antigene) zur Bildung einer Vielzahl von Antikörpern, die dann durch die ELISA-Technik nachgewiesen werden können. Positive Befunde beweisen mit Sicherheit eine stattgehabte Infektion, jedoch kann die Salmonellenfreiheit eines

Bestandes oder Tieres mit einem negativen ELISA-Befund nicht belegt werden (STEINBACH et al. 2002). Die für den Nachweis von *Salmonella*-Antikörpern verwendeten ELISAs basieren auf zwei unterschiedlichen Prinzipien. Es gibt Testsysteme, die zum einen nach der Methode eines indirekten ELISAs konzipiert sind und zum anderen auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs basieren. Beim direkten ELISA (Sandwich-ELISA) werden Mikrotiterplatten mit monoklonalen Antikörpern gegen dieses Antigen-Gemisch beschichtet und im anschließenden Schritt mit Antigenen abgesättigt. Der indirekte ELISA hat sich in der Praxis jedoch durchgesetzt und wird in Deutschland im Rahmen der Schweine-Salmonellen-Verordnung, des QS-Systems und der zugrunde liegenden „Leitlinien zur Reduzierung von Salmonellen durch Schlachtschweine in der Fleischgewinnung“ zur Bestandskontrolle genutzt (ANONYMUS 2006a). Das einheitliche Testprinzip besteht aus einer quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen die O-Antigene 1, 4, 5, 6, 7 und 12. Während der Inkubationszeit binden *Salmonella*-spezifische Antikörper aus Serum oder Fleischsaft an die mit Antigen beschichtete Mikrotiterplatte. Anschließend erfolgt eine Waschung, bei der ungebundenes Material entfernt wird. An die nach einer Inkubationszeit gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe lagern sich in einem weiteren Inkubationsschritt enzymgebundene Anti-Antikörper. Nach weiterer Waschung folgt der Zusatz eines chromogenen Substrates, welches schließlich zu einer Farbentwicklung führt.

Die Stärke der Farbentwicklung ist direkt proportional zur Menge der Antikörper (AK). Die Antikörperkonzentration kann so mittels Vergleich-Standards bekannter Enzymaktivität gemessen werden. Die Stärke dieser Reaktion wird in optische Dichte in Prozent (OD %) angegeben. Für die verschiedenen Testsysteme existiert ein jeweils spezifischer Cutoff-Wert, welche die Tiere als positiv oder negativ einstuft. Somit kann durch die Wahl des Cutoff-Wertes, die Anzahl an positiven Tieren variiert werden. Ein niedriger Cutoff-Wert führt zu einer höheren Gewichtung der Sensitivität gegenüber der Spezifität, ein hoher Cutoff-Wert zu höherer Spezifität gegenüber der Sensitivität (GREINER und GARDNER 2000).

Der in Dänemark entwickelte Fleischsaft ELISA besteht aus den Mischantigenen der LPS der Serovare *S. Typhimurium* (O-Antigene 1, 4, 5, 12) und *S. Infantis* (6, 7, 14) oder *S. Cholerasuis* (6, 7). Durch dieses Antigengemisch ist gewährleistet, dass ein Großteil der Salmonelleninfektionen in Beständen abgedeckt wird (STEINBACH und STAAK 2001). Im Jahr 1998 zeigte NIELSEN et al. (1998), dass eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von Serum- und Fleischsaftproben vorliegt. Fleischsaft setzt sich aus Lymphe, freigesetzter intrazellulärer Flüssigkeit und aus dem, aus dem Gefäßsystem ausgetretenem, Serum zusammen und gilt somit als eine physiologische, diagnostisch verwertbare Substanz,

die eine hohe Antikörperkonzentration aufweist. Der Fleischsaft-ELISA eignet sich insbesondere für die *post mortem* Diagnostik von Schlachtschweinen, da er verglichen mit dem Antikörpernachweis in Serum bei Cutoff-Werten von > 20 AK OD% eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von ebenfalls 100 % aufweist. Somit können die Bestände hinsichtlich ihrer „Salmonellen-Belastung“ kategorisiert werden. VAN DER HEIJDEN (2001) startete 2001 einen internationalen Ringversuch. Dabei wurden mehrere indirekte, auf LPS-Antigenen basierende, ELISAs bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität verglichen. Neben verschiedenen „in-house“ ELISAs wurden auch mehrere kommerziell verfügbare Testkits einbezogen. Bei der Spezifität konnte eine zufrieden stellende Übereinstimmung zwischen den Testkits festgestellt werden, wobei sich jedoch große Differenzen hinsichtlich der Sensitivität zeigten. Somit wurde offenbar, dass eine deutliche Notwendigkeit besteht, international verfügbarer Referenzseren, zur Verfügung zu stellen. BLAHA (2003c) stellte dar, dass die drei ELISA-Testkits der Firmen Labor Diagnostik Leipzig (LDL), IDEXX und Boehringer/Ingelheim zu gleichen Ergebnissen bezüglich der Einteilung der Schweinebestände in die drei Risikogruppen führten. KAVANAGH et al. (2004) ermittelten, dass die Ergebnisse der ELISA-Tests von IDEXX, Guildhay und Labor Diagnostik Leipzig grundsätzlich übereinstimmen.

2.2.2.2.2 ELISA-Testsysteme

In Deutschland sind derzeit nach § 17 c des Tierseuchengesetzes (TSeuchG) vier verschiedene indirekte ELISA-Systeme zugelassen.

1. Salmotype[®] Pig STM (*S. Typhimurium*)-WCE[™] (whole cell ELISA) ELISA zum Nachweis von Immunoglobulin (Ig) M-, IgG- und IgA-Antikörpern gegen *Salmonella* Typhimurium in Serum-, Plasma- oder Fleischsaftproben von Schweinen der Firma (Fa.) Labor Diagnostik Leipzig (Kurzform: Salmotype[®] Pig STM-WCE[™]).
2. Salmotype[®] PigScreen[™] ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen Salmonellen in Serum-, Plasma- oder Fleischsaftproben bei Schweinen der Fa. Labor Diagnostik Leipzig (Kurzform: Salmotype[®] PigScreen[™]). Es werden Antikörper der O-Antigene 1, 4, 5, 6, 7 und 12 erfasst.
3. HerdChek[®] Swine Salmonella[™] Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Salmonella* spp. beim Schwein der Fa. IDEXX, Wörrstadt. Es werden Antikörper gegen die Serogruppen B, C1 und D erfasst.
4. Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] zum Nachweis von Antikörpern gegen *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* und *S. Infantis* beim Schwein der Fa. Svanova, Uppsala, Schweden.

Die drei ELISA-Systeme Salmotype[®] PigScreen[™] (PigScreen[™]), HerdChek[®] Swine Salmonella[™] (HerdChek[®]) und Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] (Enterisol[®]) stellen auf einem fast identischen LPS-Gemisch basierende Testsysteme dar und werden nach dem allgemeinen Wirkprinzip eines indirekten ELISA durchgeführt. Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] (WCE-ELISA[™]) basiert hingegen auf einem Vollzellysat-Antigen von *Salmonella* Typhimurium DT104. Zudem ist der Nachweis der einzelnen Isotypen IgM, IgG und IgA Antikörper möglich. Die jeweiligen Seren werden in vier Stufen verdünnt und an einem definierten Standard verglichen, jeweils für IgA, IgG und IgM. Die ermittelte optische Dichte wird mittels Referenzstandardmethode und einer speziell entwickelten Software (Salmosoft[™], Labor Diagnostik Leipzig) in ELISA Units (E.U.) angegeben.

Der Test eignet sich, wie die drei LPS-ELISA auch, sowohl für Seren als auch für Fleischsaft. Dieser ELISA erkennt hauptsächlich gegen *S. Typhimurium* gerichtete Antikörper bei Schweinen und ermöglicht eine detaillierte Beschreibung der Infektions- und Impfdynamik in der Herde oder am einzelnen Tier (LEHMANN et al. 2004). LEHMANN et al. (2003) zeigten, dass durch die isotypspezifische Immunantwort eine Unterscheidung akuter

Infektionen bei geimpften und nicht geimpften Tieren möglich ist. Somit führt dies zu einer Erhöhung der Akzeptanz von Lebendvakzinen unter diagnostischer Kontrolle. Bei der Durchführung des Tests erfolgt keine, in der Serologie häufig anzutreffende und bei den anderen drei Tests angewandte, Einpunktbestimmung. Stattdessen werden die Serumproben seriell verdünnt und anschließend mittels Referenzstandardmethode zum Positivstandard ins Verhältnis gesetzt. Dem Referenzstandard (Positivstandard) wurde eine definierte Aktivität zugewiesen, ausgedrückt in ELISA-Units (E.U.). Die Titrationsstufen werden logarithmiert und bilden die x-Achse. Die gemessenen OD-Werte ergeben die y-Achse. Somit erhält man die Beschreibung der Titrationskurve mittels linearer Regression im x,y-Koordinatensystem. Analysiert wird dann das Verhältnis eines definierten Punktes, beziehungsweise der Gerade zu dem entsprechenden Vergleichspunkt oder der Vergleichsgerade des Referenzstandards (ANONYMUS 2006c). Für die Berechnung wurde eine spezielle Software (SalmoSoft™) entwickelt.

2.2.3 Molekularbiologische Diagnostik

2.4.3.1 DNA-Hybridisierung

DNA-Hybridisierungen beruhen auf der Reaktion der nachzuweisenden DNA mit einer zuvor *in vitro* markierten komplementären Einzelstrang-DNA oder -RNA. Diese Gensonde bildet mit der komplementären Target-DNA ein Hybrid, welches durch die meist auf Fluoreszenzfarbstoffen beruhende Markierung visualisiert und damit nachgewiesen werden kann. Oft verwendete Sonden für den Nachweis von Salmonellen basieren z.B. auf hoch konservierten und spezifischen Bereichen der 23S rDNA. Da diese Gensonden zumeist eine hohe Sensitivität sowie eine sehr hohe Spezifität aufweisen, eignet sich diese Methode besonders zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen. So konnten Untersuchungen z.B. zeigen, dass der Gene-Track®-Test für den Nachweis von Salmonellen in bestimmten Lebensmitteln signifikant bessere Ergebnisse erzielt, ansonsten aber genauso erfolgreich eingesetzt werden kann wie kulturelle Standardmethoden (STEWART et al. 2002).

Ebenfalls auf dem Grundprinzip der DNA-Hybridisierung beruhend, jedoch methodisch vollkommen andere Nachweissysteme stellen die Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) und die Real-Time-PCR dar. Wie bei der DNA-Hybridisierung und der nachfolgend beschriebenen Real-Time-PCR auch, werden bei der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung die zu untersuchenden Proben zumindest einem Voranreicherungsschritt, z.B. in gepuffertem

Peptonwasser, unterzogen. Anschließend wird die erhaltene Bakteriensuspension fixiert und mit den entsprechenden *Salmonella*-spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden inkubiert und hybridisiert. Die folgende Detektion erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops. Insgesamt weist die FISH eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität als die etablierten Kulturmethode auf und sie verkürzt zudem den für die Diagnostik erforderlichen Zeitaufwand um circa die Hälfte (FANG et al. 2003; STENDER et al. 2001). Als nachteilig erweist sich jedoch der beträchtliche Arbeitsaufwand dieser Methode.

Eine weitere Methode, die sich der DNA-Hybridisierung bedient, ist die Sonden-basierte Real-Time-PCR. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Verfahren kommt es hier jedoch zur Hybridisierung von *Salmonella*-spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonden mit parallel dazu in einer *Salmonella*-spezifischen PCR hergestellten Amplifikaten, was mit einer Steigerung sowohl der Sensitivität als auch der Spezifität verbunden ist. Eine Sensitivitäts-Steigerung ist darüber hinaus durch eine Voranreicherung der zu untersuchenden Proben möglich, aus der anschließend die Target-DNA für die *Salmonella*-spezifische PCR gewonnen wird. Somit sind, verglichen mit dem kulturellen Salmonellen-Nachweis, Sensitivitäten von 100% sowie sehr niedrige Nachweisgrenzen von 1 CFU pro Milliliter der zu untersuchenden Probe (z.B. rohe Fleischprodukte) möglich (CHEN et al., 2000; ELLINGSON et al., 2004). Zudem bietet die quantitative Real-Time-PCR als einzige nicht kulturelle Nachweismethode die Möglichkeit, die in der Probe enthaltenen Salmonellen zu quantifizieren (FEY et al., 2004; SEO et al., 2004).

2.4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die wichtigste zuerst publizierte PCR-Methode zum Nachweis von Salmonellen stammt von WIDJOJOATMODJO et al. (1992). Diese PCR nutzt Oligonukleotide, die auf einem Abschnitt des Replikationsgens *oriC* basieren.

RAHN et al. (1992) wählten für ihre Salmonellen-spezifische PCR Oligonukleotide, die auf dem von GALAN et al. (1992) entdeckten *invA*-Gen basieren. Um die Spezifität dieser PCR-Methode zu überprüfen, wurden insgesamt 630 *Salmonella*-Reinkulturen, die 102 Serovaren angehörten, sowie 142 Nicht-Salmonellen-Spezies aus insgesamt 21 verschiedenen Genera untersucht. Das Detektions-Limit dieser Methode lag bei 3×10^2 CFU, die Spezifität bei 100%. Jedoch wurden inzwischen Spezifitäts-Probleme insbesondere bei der Untersuchung von Organmaterial vom Schwein beobachtet, die durch bestimmte Varietäten von *E. coli* verursacht werden (ARNOLD et al., 2004).

OLSEN et al. (1991) konnten durch Sequenz-Analyse von 20 verschiedenen *Salmonella*-Serovaren einen 2.3 kb großen DNA-Bereich ermitteln, der eine komplette Basenhomologie in allen Serovaren aufwies. Darauf aufbauend entwickelten dann AABO et al. (1993) ein Oligonukleotidpaar, das anhand von 146 Salmonellen-Stämmen und 41 Nicht-Salmonellen-Spezies auf seine Spezifität geprüft wurde, die bei dieser PCR ebenfalls bei 100% lag.

Die oben beschriebenen Oligonukleotide nach RAHN et al. (1992) und AABO et al. (1995) werden vom Deutschen Institut für Normung, e.V., in der DIN 10135 als geeignete Oligonukleotidpaare für den Nachweis von Salmonellen angegeben. Ausdrücklich wird in der DIN-Norm darauf hingewiesen, dass nach fachlicher Prüfung auch andere geeignete Oligonukleotide für den Nachweis von Salmonellen eingesetzt werden dürfen. Eine solche geeignete Salmonellen-PCR ist zum Beispiel die ebenfalls auf dem *invA*-Gen basierende PCR von ARNOLD et al. (2004), die insbesondere bei der Untersuchung von Organmaterial Vorteile hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität gegenüber der etablierten PCR von RAHN et al. (1992) bietet.

Um die Salmonellen auch aus klinischen Proben isolieren zu können, wurden zudem mit spezifischen Antikörpern beladene magnetische Partikel verwendet. Diese Technik in Kombination mit der oben genannten PCR-Methode wurde dann als „Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay“ (MIPA) bezeichnet. Das Detektionslimit der MIPA-Methode für die Isolation von Salmonellen aus Stuhlproben wurde mit 10^5 CFU/g Faeces und 3 CFU/25g Rinderhackfleisch angegeben (FAVRIN et al. 2003; FLUIT et al. 1995; HSIH und TSEN 2001).

2.3 Epidemiologie des Genus *Salmonella*

Das Habitat der Salmonellen stellt der Magen-Darm-Trakt von Tieren und Menschen dar. Jedoch ist es ihnen durch eine hohe Tenazität auch ermöglicht, wochen- bzw. monatelang, in der kontaminierten Umwelt zu überleben. Dabei weisen Salmonellen, aufgrund ihrer geringen Wirtsspezifität, eine schwer überschaubare Infektkette auf. Der dominierende Infektionsweg erfolgt oral. Aber auch aerogen, konjunktival oder über den Nasen-Rachenraum ist ein Eintritt möglich (OLIVEIRA et al. 2004; PROUX et al. 2001). Salmonellen sind bei fast allen Tierarten zu finden, wobei besonders die Reptilien mit häufig latenten Infektionen und einem breitem Serovarspektrum zu erwähnen sind. Die Gattung *S. enterica* spp. *enterica* trifft man bevorzugt bei warmblütigen Tieren an, während sich die übrigen Subspezies bei Kaltblütern

und in der Umwelt befinden (SELBITZ 2006). Der Befallsgrad der Wildvögel und Schädner steigt dabei mit ihrem Kontakt zu Klär- und Abwasseranlagen, Müll- und Schlachthöfen und abwasserhaltigen Hafenbecken (FRANSEN et al. 1996).

Die Vertreter des Genus *Salmonella* weisen große Unterschiede in der Anpassung an verschiedene Wirte auf und lassen sich daher nach ihrem Infektionsspektrum in vier verschiedene epidemiologische Gruppen einteilen (SELBITZ und BISPING 1995).

1. Mensch-adaptierte Serovare:

Diese erweisen sich für Tiere als bedeutungslos. Vertreter dieser Gruppe sind *S. Typhi* und *S. Paratyphi*, welche beim Menschen eine primäre Salmonellose in der typhösen Form hervorrufen.

2. Tier-adaptierte Serovare:

Hierzu zählen z.B. *S. Dublin* beim Rind oder *S. Gallinarum* beim Huhn. Diese Gruppe steht für ausgeprägte Krankheitsbilder und seuchenhafte Krankheitsverluste. Infektionen beim Menschen sind jedoch selten, wobei in Einzelfällen schwere Erkrankungen mit *S. Dublin* bekannt wurden.

3. Keine Anpassung an bestimmte Tierarten, hochvirulent:

Zu dieser Gruppe gehören die Haupterreger von Zoonosen, wie z.B. *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis*. Sie zeigen eine zum Teil (z.T.) hohe Invasivität und können zu schweren seuchenhaften Krankheitsverläufen führen, oder auch latent verlaufen.

4. Keine Anpassung an bestimmte Tierarten, schwachvirulent:

Diese Gruppe umfasst über 2000 Serovare. Beim Tier verlaufen sie meist latent, während sie beim Menschen eine punktuelle Bedeutung als Zoonoseerreger, z.B. *S. Infantis*, *S. Derby* besitzen (SELBITZ 2006).

2.3.1 Salmonelleninfektionen des Menschen

Die Infektion des Menschen mit Salmonellen erfolgt in erster Linie auf oralem Weg über primär oder sekundär kontaminierte Lebensmittel (SANDER 1993). Jedoch sind auch zunehmend Infektionen des Menschen, v.a. der Kinder und immungeschwächter Personen durch Kontakt mit salmonelleninfizierten Haustieren, wie z.B. Ziervögel oder Reptilien, zu beobachten (KRAUSS et al. 2004). Ebenso kann eine Infektion auch durch die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgen, was jedoch nur in 10 % der Infektionen als Ursache zutrifft

(RASCH und SCHRADER 1996). Bei gesunden Menschen ist die krankheitsauslösende Infektionsdosis in aller Regel hoch, während bei Kindern, älteren oder immungeschwächten Menschen schon eine niedrige Dosis von unter 100 Keimen ausreicht.

Nach dem klinischen Bild unterteilt man folgende Formen der Salmonelleninfektion:

- Gastroenteritis (mit 70% die häufigste Manifestationsform)
- typhöser Verlauf (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*)
- Bakteriämie mit oder ohne Herdinfektion (*S. Dublin*)
- asymptomatisches Ausscheidertum

(DEDIÈ et al. 1993)

Die für Lebensmittelinfektionen wichtigste Verlaufsform ist die meldepflichtige Gastroenteritis (*Enteritis infectiosa*) (KRAUSS et al. 2004). Häufigste Verursacher der *Enteritis infectiosa*, welche noch Anfang der 90-er Jahre zu 81 % durch Salmonellen bedingt war, sind *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* (ZASTROW und SCHONEBERG 1993). Bis 1980 wurde in Europa ein stetiger Anstieg der Salmonellosefälle beobachtet. Nachdem die Zahlen bis 1985 deutlich zurückgegangen waren, folgte bis 1992 ein erneuter Anstieg. Seit 1995 ist wieder ein steter Rückgang der gemeldeten Infektionen zu verzeichnen (HARTUNG 1999). Mit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) werden die Daten zu humanen Salmonellosen zentral erfasst. Dies ermöglicht exaktere statistische Aussagen und ist insbesondere bedeutungsvoll bei diffusen Ausbrüchen. Die Salmonellose ist nach den *Camphylobacter*infektionen mit ca. 65000 Erkrankungen pro Jahr die am häufigsten registrierte lebensmittelbedingte bakterielle Infektionskrankheit (ANONYMUS 2004a). Man vermutet jedoch, dass nur 1 bis 10 % der Erkrankungen tatsächlich amtlich gemeldet werden und geht somit von einer zehn- bis hundertfachen Dunkelziffer aus. Dies bestätigt auch der Vergleich mit Studien aus anderen Industrieländern (VOETSCH et al. 2004).

Die Klinik einer *Enteritis infectiosa* zeichnet sich nach einer Inkubationszeit von 8-48 Stunden durch Initialsymptome, wie Schwindel, Übelkeit und Erbrechen aus, welche jedoch meist innerhalb weniger Stunden spontan sistieren. Neben kurzfristigem Schüttelfrost und Fieber (1-2 Tage) können sich krampfartige Bauchschmerzen und Durchfälle für ca. 4 Tage entwickeln. Die Diarrhoe variiert zwischen 2-3 breiigen Stühlen pro Tag oder schweren Cholera ähnlichen Verläufen (DEDIÈ et al. 1993). In diesem Fall ergeben sich therapeutisch

weitere Komplikationen, wenn es sich um einen Erreger wie *S. Typhimurium* DT104 handelt, bei welchem eine breite Antibiotika-Mehrfachresistenz besteht. Besonders bei immungeschwächten Personen kann es zum Auftreten von Komplikationen wie z.B. Sepsis, Meningitis, Osteomyelitis, Arthritis, Harnwegsinfekten oder Endokarditis kommen (KRAUSS et al. 2004). Jedoch ist es ebenso möglich, dass eine asymptomatische Ausscheidung das einzige Zeichen einer erfolgten Salmonelleninfektion ist. Von echten Dauerausscheidern spricht man, wenn nach einem Jahr noch Salmonellen im Stuhl nachweisbar sind, wie dies häufig bei Kindern der Fall ist (DEDIÈ et al. 1993).

Die humane Salmonelleninfektion stellt sich hauptsächlich als ein Hygieneproblem dar, da kontaminierte Lebensmittel die Hauptinfektionsquelle sind. Die Erreger können in diesen Lebensmitteln auch in einen Ruhezustand übergehen oder subletal vorliegen. Somit sind sie kaum kultivierbar oder nachweisbar und bleiben damit oft unerkannt. Infolgedessen ist die Verbraucheraufklärung hinsichtlich einer ausreichenden Küchenhygiene eine der wichtigsten Präventivmassnahmen (HOF et al. 2000).

2.3.2 Salmonelleninfektionen des Schweines

Auch beim Schwein unterscheidet man zwischen wirtsadaptierten und nicht wirtsadaptierten Serovaren. Dabei zählen *S. Cholerasuis* und *S. Typhisuis*, welche in Deutschland derzeit nur gering verbreitet sind zu den wirtsadaptierten Serovaren (Selbitz 2006). Diese führen meist zu einer primären Salmonellose mit einer starken klinischen Ausprägung. Jedoch sind in den entwickelten Ländern vorwiegend latente Salmonelleninfektionen der Schweine, von denen die Gefahr einer Lebensmittelinfektion ausgeht, von größerer praktischer Bedeutung. Verursacher dieser sekundären Salmonellosen sind *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Aber auch zahlreiche andere Serovare, wie z.B. *S. Infantis* oder *S. Derby*, welche zu den nicht wirtsadaptierten Serovaren zählen, können eine Rolle spielen. Serologisch wurden im Jahre 2005 (Abbildung 2) 72 % der vom Schwein isolierten, nicht Lebensmittel-assoziierten Salmonellen-Isolate vom Nationalen Referenzlabor für Salmonellen (NRL-Salm) dem Serovar *S. Typhimurium* zugeordnet, im weiten Abstand gefolgt von *S. Derby* mit 6,8 %. *Salmonella Infantis* wurde bei 2% der Isolate aufgefunden (HELMUTH et al. 2003).

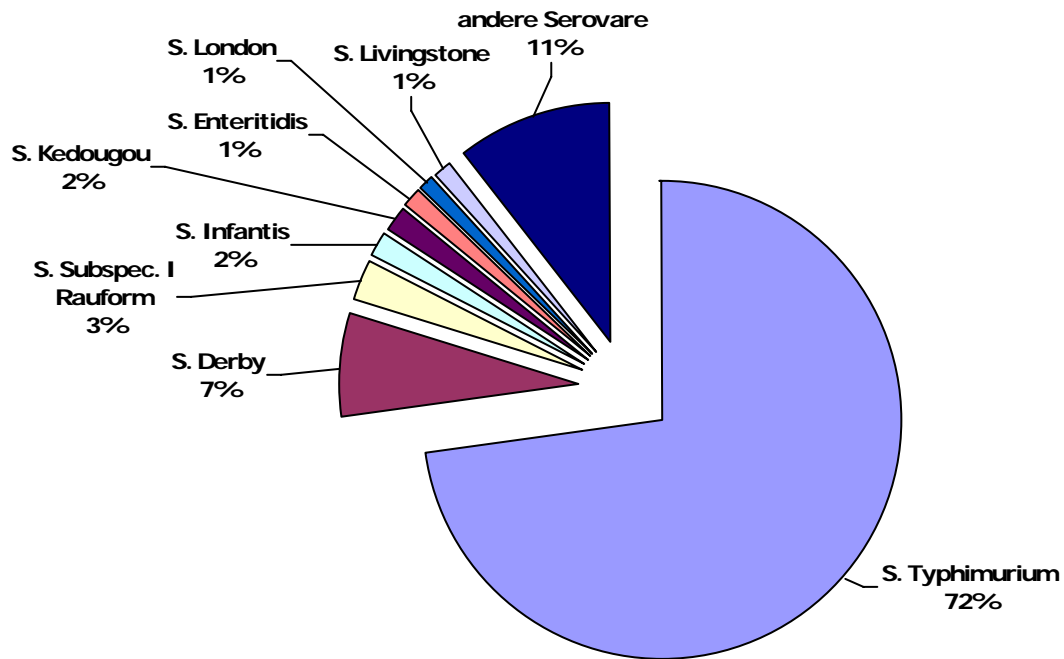


Abbildung 2. Anteil verschiedener *Salmonella*-Serovare an den im Jahr 2005 durch das NRL-*Salmonella* (BfR) vom Schwein isolierten *Salmonella*-Isolaten nach RÖSLER (2007).

2.3.2.1 Primäre Salmonelleninfektionen

Der Verlauf der primären Salmonellose ist abhängig von der Abwehrlage des Tieres, die durch verschiedene Stressoren, den Manifestationsort und das Infektionsserovar geprägt wird (MARG et al. 2001). Vor allem tieradaptierte Serovare neigen zu endemischen, latenten Infektionen mit kongenital-vertikaler Übertragung, Aborten und Jungtierkrankheiten (DEDIÈ et al. 1993). Dabei ist die enteritische Form vorherrschend, während septikämische, pulmonale oder meningitische Formen als Komplikation auftreten können (DEDIÈ et al. 1993). Bei einer Inkubationszeit von 2 bis 8 Tagen dringen die pathogenen Formen in die Enterozyten der Darmschleimhaut ein und sind schon nach 48h im Blut nachweisbar (PLONIAT und BLICKHARDT 2006). Die Salmonellosen verlaufen subakut über 2 bis 4 Tage oder auch chronisch über Wochen bis Monate. Erfolgt eine Monoinfektion mit *Salmonella* Cholerasuis, so kommt es zu einer akuten Septikämie mit Kolitis und miliaren Lebernekrosen. Charakteristisch für septikämische Salmonellosen sind plötzliche Todesfälle

mit blauroter Verfärbung der Ohrmuscheln, der Rüsselscheibe, des Unterbauches und der Gliedmaßen. In den betroffenen Beständen sind Fieber, Erbrechen, Diarrhoe und Zyanosen zu beobachten. Chronisch verläuft die eher seltene Infektion mit *S. Typhisuis*. Diese führt zu nekrotisierender Kolitis, verkäsender Lymphadenitis der Mediastinal- und Pharyngeallymphknoten, sowie zu herdförmigen Pneumonien (PLONIAT und BLICKHARDT 2006; SCHWARTZ 1999).

2.3.2.2 Sekundäre Salmonelleninfektionen

Die sekundären Salmonelloseen neigen eher zur Chronizität, können sich jedoch auch, je nach Abwehrlage und Infektionsdosis, als perakute und akute Verläufe äußern. Von klinischen Erkrankungen sind vorrangig Absetzer und Jungschweine bis zu etwa 60 kg betroffen, wobei Stressfaktoren während des Absetzens und der Zusammenstellung der Mastgruppen eine große Rolle spielen (SELBITZ 2006). Während kleine Dosen von 10^3 bis 10^5 Kolonie bildender Einheiten (KBE) bei Schweinen zu vorübergehender Haftung im Darm mit Ausscheidung in den Faezes führen, kommt es bei höheren Dosen von 10^7 bis 10^9 KBE dagegen zu längerer, oft überaus hartnäckiger Dauerausscheidung, welche jedoch nur vereinzelt mit Erkrankungssymptomen verbunden ist (DEDIÈ et al. 1993). Diese Faktoren erleichtern u.a. die Kontamination von Produkten im Schlachtprozess (GAREIS 1995). Bei sekundären Salmonelloseen erfolgt der Erreger-Eintrag zum großen Teil über kontaminiertes Futter, wobei bei *S. Typhimurium* auch belebte Vektoren als Infektionsquelle nicht zu vernachlässigen sind (BERENDS et al. 1996; OSTERBERG et al. 2006). Besonders schwere Verlaufsformen der sekundären Salmonellose des Schweines können durch *S. Typhimurium* DT 104 ausgelöst werden, wobei eine nekrotisierende Kolitis und Typhlitis auftreten kann.

2.3.2.3 Ausscheidungsmuster

Die verschiedenen Serovarietäten von *S. enterica* sind durch eine sehr variable Ausscheidungsdynamik gekennzeichnet. Dabei variieren Prävalenz und Serotypenprofil je nach Tiergruppe und Zeit (DAVIES 1999; FUNK et al. 2001b; ROSTAGNO et al. 2004). In der Literatur sind dazu unterschiedliche Angaben zu finden. So konnten BLAHA et al. (1997) schon zwei Stunden nach oraler Infektion eine Ausscheidung der Salmonellen mit dem Kot feststellen. Ebenso erkannten HURD et al. (2001) dass, nachdem sie Schweine einer kontaminierten Umgebung ausgesetzt hatten, schon nach 30 Minuten eine Infektion erfolgt

war. In einer weiteren Studie waren bei experimenteller Infektion mit *S. Typhimurium* über 10 Tage Salmonellen im Kot und anschließend über einen Zeitraum von 4 bis 5 Monaten noch gelegentlich nachweisbar. Dabei wurden bei der Schlachtung über 90% der Salmonellen in den mesenterialen Lymphknoten, den Tonsillen, dem Caecum und dem Kot aufgefunden (FEDORKA-CRAY et al. 1994). Des Weiteren wurde offenbar, dass es während des Transportes zum Schlachthof häufig zu einer Proliferation der Salmonellen durch den Transportstress kommt (MARG et al. 2001), wobei sich auf dem Schlachthof selbst zusätzlich häufig Kreuzkontaminationen ereignen (SWANENBURG et al. 2001).

2.3.2.4 Prävalenz in Deutschland

Bisher existieren noch keine flächendeckenden Untersuchungen zur Prävalenz von Salmonellen in Schweinebeständen, in Schlacht- und Verarbeitungsbetrieben oder in Lebensmitteln (DORN et al. 2003). In Nordrhein-Westfalen wurde 1995 eine Pilotstudie durchgeführt, in welcher 6272 Schweine in Schlachthöfen auf Salmonellen untersucht wurden. Dabei erwiesen sich 13,2 % von 937 Poolproben des Gallenlebersystems als positiv. Des Weiteren erfolgte 1996 in Nordwestdeutschland eine Studie, bei welcher von 11.942 Schweinen aus 137 Betrieben die Darmlymphknoten bakteriologisch auf Salmonellen untersucht wurden. Dabei wurde offenbar, dass 24% der Mastbetriebe positive Tiere aufwiesen, wobei die Prävalenz der Einzeltiere bei 3,5% lag (GANTER et al. 1998).

Das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BfVV) führte 1996 eine Untersuchung durch, bei der sieben Schlachthöfe in Bayern, Baden-Württemberg, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Sachsen-Anhalt und Thüringen auf Salmonellen getestet wurden. Die Prävalenz lag in Kotproben bei 3,7%, in Darmlymphknoten bei 3,9% und an der Tierkörperoberfläche bei 4,7% (KÄSBOHRER et al. 2000).

LUDEWIG und FEHLHABER (2001) untersuchten 2001 in Sachsen 89 Mastbetriebe, von denen 93,3% *Salmonella* positive Tiere aufwiesen. Allerdings gab es nur wenig hochkontaminierte Betriebe. Das BfR meldete für 2002 einen Anstieg des Nachweises von Salmonellen in Schweineherden auf 9,01%, welcher 2001 noch mit 7,27% verzeichnet wurde. Im Jahr 2002 wurde das Fleisch von Schlachtschweinen bakteriologisch untersucht, wobei in 0,54% der Fälle Salmonellen nachgewiesen wurden. Dagegen zeigten Untersuchungen mittels eines Fleischsaft-ELISAs im Schlachthof einen positiven Titer bei 5,8% der untersuchten Tiere (ANONYMUS 2003).

2.3.2.5 Risikofaktoren für das Auftreten von Salmonelleninfektionen in Schweinebeständen

Es gibt zahlreiche Faktoren, die das Auftreten von Salmonellen in Schweinebeständen erhöhen können. Im Folgenden werden daher nur einige wichtige Beispiele dargestellt.

Von großer Bedeutung sind Tierbewegungen im Tierbestand und die Tierherkunft. Dabei können Salmonellen von Sauen auf die Nachkommen übertragen werden. Zudem weisen Zuchttiere eine hohe Prävalenz von Salmonellen auf. Daneben spielt die Art der Tierhaltung eine wichtige Rolle. Dazu gibt es unterschiedliche Untersuchungen. VAN DER WOLF et al. (2001) stellten 2001 in ihren Untersuchungen fest, dass kleinere Betriebe eine höhere Salmonellenprävalenz aufweisen. Dagegen zeigte DAHL (1998a) in Dänemark, dass größere Betriebe mit höheren Prävalenzen verbunden sind. Neben der Betriebsgröße ist auch die Bodenbeschaffenheit von Bedeutung. So stellten DAVIES et al. (1997) fest, dass solide Böden als Risikofaktor gelten, wogegen Vollspaltenböden zu einer niedrigeren Prävalenz führen (NOLLET et al. 2003). FUNK et al. (2001a) zeigten 2001, dass eine hohe Belegdichte zu einem vermehrten Auftreten von Salmonelleninfektionen führt. Dies lässt sich damit erklären, dass bei niedriger Belegdichte, weniger Stress für die Tiere vorhanden ist. Dieser Stress und Stressoren, wie z.B. neue Tiergruppen oder Transporte führen zu einer vermehrten Ausscheidung von Salmonellen (MARG et al. 2001). Auch die Hygiene, Reinigung und Desinfektion in den Ställen bilden wichtige Voraussetzungen, wobei der Mangel an Betriebshygiene einen der wichtigsten Risikofaktoren für den Eintrag von Salmonellen in die Bestände darstellt (BERENDS et al. 1996). Daneben spielt die kontaminierte Stallumgebung eine große Rolle (HURD et al. 2001).

Ebenso können über das Futter Salmonellen in den Bestand eingetragen werden. HARRIS et al. (1997) zeigten 1997, dass Futter mit Salmonellen kontaminiert sein kann, wodurch eine Infektion der Schweine mit Salmonellen hervorgerufen werden kann. Dabei besitzt pelletiertes, hitzebehandeltes Futter ein höheres Risiko, Salmonellen in Bestände zu tragen (DAHL 1998b), als nicht hitzebehandeltes, mehlartiges Futter. JORGENSEN et al. (1999) stellten einen Zusammenhang zwischen nicht hitzebehandeltem Futter und dem Gehalt an Milchsäurebakterien dar. Diese verhindern das Salmonellenwachstum im Futter. Auch der Mensch selbst kann eine entscheidende Rolle bei der Einschleppung von Salmonellen in den Betrieb spielen. So stellt salmonellenausscheidendes Betriebspersonal eine direkte Eintragsquelle für Salmonellen dar. Ebenso besteht ein direkter Zusammenhang zwischen einer hohen Zahl an Besuchern und dem vermehrten Auftreten von Salmonellen im Bestand.

Aber auch Haustiere und Wildtiere (Ratten, Mäuse, Vögel) erhöhen laut FUNK et al. (2001a) die Seroprävalenz in Betrieben.

2.4 Salmonellenmonitoringprogramme

Die Inzidenz für die humane Salmonellose stieg in den meisten Industrieländern in den 80er und 90er Jahren stark an. Eine starke Streuung von *Salmonella*-Clones in verschiedenen Sektoren der tierischen Lebensmittelproduktion wird für dieses Ansteigen verantwortlich gemacht (THORNS 2000). Dabei erwiesen und erweisen sich als wichtigste Infektionsquelle die, vom Tier stammenden, Lebensmittel. Im Sinne des Verbraucherschutzes ist es sinnvoll die Salmonelleninfektionen vorbeugend zu verhindern, das Risiko des Eintrags von Salmonellen in die Fleischproduktionskette zu mindern und Eintragsquellen in Mastbetriebe zu erkennen und zu beseitigen. Dabei besteht der erste Schritt darin, infizierte Bestände, mit erhöhtem Eintrag von Salmonellen in die Fleischproduktion, aufzufinden. In der zweiten Stufe werden die Eintragsquellen identifiziert und abgestellt. In Europa betreiben außer Deutschland auch schon andere Länder Salmonellenmonitoringprogramme. Dazu gehören v.a. Dänemark und Schweden, aber auch Finnland, Irland, Österreich, Frankreich und die Niederlande.

2.4.1 Dänisches Salmonellenüberwachungsprogramm

In den frühen 90er Jahren war *S. Typhimurium* DT12, als der am meisten auftretende *Salmonella*-Clon in Dänemark, verantwortlich für Salmonelleninfektionen bei Schweinen und somit auch für Lebensmittelinfektionen (BAGGESEN und WEGENER 1994). Im Frühling 1993 kam es darüber hinaus zu einer humanen Epidemie infolge einer Lebensmittelinfektion mit *S. Infantis* (WEGENER und BAGGESEN 1996). Dies stellte den Startschuss für ein landesweites *Salmonella enterica* Kontroll- und Überwachungsprogramm in Dänemark dar (MOUSING et al. 1997). Der erste Schritt bestand 1993 in der Überwachung von frischem Schweinefleisch. So wurde vom „Ministerium for Food, Agriculture and Fisheries of Denmark“ und der „Danish Bacon and Meat Council“ ein Programm eingeführt, um Schweinefleisch als Quelle humaner Salmonellosen zu eliminieren (WEGENER und BAGGESEN 1996). Die Überwachung von Schweinebeständen mittels serologischer Untersuchung von Fleischsaftproben folgte ab 1995 (CHRISTENSEN et al. 2002). Fünf Jahre später wurde das Klassifikationsschema des Überwachungsprogrammes evaluiert und

überarbeitet. Das primäre Ziel bestand darin, das Auftreten von Salmonellen in den Schweinebeständen und somit auch im Schweinefleisch zu reduzieren. Das Klassifikationschema basiert auf einer serologischen Überwachung mittels Fleischsaftproben. Diese werden mit einem *mix*-ELISA, der die O-Antigene 1,4, 5, 6, 7 und 12 enthält, getestet (NIELSEN et al. 1995). Dazu werden im Schlachthof von dem jeweiligen Tier 10 g Fleisch gesammelt, welches tiefgefroren wird. Nach dem Auftauen wird der Fleischsaft genutzt, um Antikörper gegen Salmonellen zu bestimmen (NIELSEN et al. 1998).

Anfangs wurde ein Cutoff-Wert von 40 OD% gewählt (MOUSING et al. 1997). Dabei wurden die Proben mit einem Cutoff-Wert >40 OD% als positiv und bei ≤ 40 OD% als negativ gewertet. Die Anzahl der nötigen Proben für eine Klassifizierung ist abhängig von der Größe des Schweinebestandes, wobei Bestände, welche weniger als 100 Schweine pro Jahr zum Schlachter bringen, ausgenommen sind. Alle serologischen Ergebnisse werden in eine zentrale Datenbank eingetragen (Zoonosis Register, ZOOR), wobei die Herden einmal monatlich, nach dem Ergebnis der jeweils letzten drei Monate, in die jeweilige Prävalenzstufe eingeteilt werden. Liegt eine akzeptable Prävalenz von Salmonellen in den Beständen vor, so wird der Bestand in Kategorie eins eingeordnet und es werden keine Maßnahmen eingeleitet. Während die Prävalenz der Salmonelleninfektionen für Kategorie zwei noch gebilligt wird, so stellt sie in Kategorie drei eine unakzeptabel hohe Rate von Salmonellenantikörpern dar. Wird ein Bestand in Kategorie zwei oder drei eingestuft, erfolgt die Bestimmung des *Salmonella*-Serotyps mittels bakteriologischer Untersuchung. Zusätzlich wird ein Berater hinzugezogen, welcher neue Vorschläge für das Betriebsmanagement erarbeitet.

Ist ein Bestand in Kategorie drei eingestuft worden, so werden dessen Schweine unter besonderen Bedingungen geschlachtet (MOUSING et al. 1997). Um Kreuzkontamination zu vermeiden werden die Tiere so spät wie möglich zum Schlachthof gebracht. Dort dürfen sie nicht über Nacht aufgestellt bleiben und werden zuletzt geschlachtet. Des Weiteren dürfen die Köpfe der Tiere nicht gespalten werden, und ebenso werden Geschlinge und Intestinum entweder als unbrauchbar beurteilt oder hitzebehandelt. Zusätzlich werden stichprobenartig Tupferproben vom Schlachtkörper entnommen. Sollten diese Proben eine zu hohe Salmonellenbelastung aufweisen, muss das Fleisch hitzebehandelt oder anderweitig haltbar gemacht werden (SORENSEN et al. 2004). In Folge dieser Maßnahmen wird der Schlachtwert für zusätzlich entstehende Kosten um 3 bis 9% gemindert. Ein Erfolg dieser Aktionen ist in der Statistik ersichtlich, denn 1993 betrug die Anzahl der humanen Salmonellosen noch 1100 pro Jahr, welche bis zum Jahr 2000 auf 166 gesenkt werden konnte (Anonymus 2002). Aus Analysen des alten Überwachungsschemas wurde im Jahr 2001 ein

überarbeitetes Schema erstellt und eingeführt. Das neue Überwachungsprogramm umfasst die gesamte Produktionskette vom Futter bis zum Frischfleisch (CHRISTENSEN et al. 2002). Die Probenanzahl pro Herde wurde erhöht, so dass eine genauere Überwachung kleinerer Herden stattfinden konnte. Dagegen wurde die Schwelle zur Beteiligung am Salmonellenüberwachungsprogramm von 100 Schweinen auf 200 Schweine pro Jahr angehoben.

Bei Einführung des Programms wurde der Cutoff-Wert aufgrund der hohen Seroprävalenz auf 40 OD% gesetzt, da es sonst zu einem enormen Aufwand an bakteriologischen Untersuchungen und Spezialschlachtungen gekommen wäre. Nach deutlich sinkender Seroprävalenz war es nun möglich, den Cutoff-Wert auf 20 OD% herabzusetzen. Je geringer der Cutoff-Wert, desto besser ist die Übereinstimmung zwischen bakteriologischer Untersuchung und Seroprävalenz. Zu Beginn des Programms wurde das serologische Ergebnis der letzten drei Monate im Durchschnitt gewertet, wohingegen die Ergebnisse nun im Verhältnis von 3:1:1 gewichtet werden. Dies hat eine Verbesserung der Beziehung zwischen bakteriologischer und serologischer Untersuchung zur Folge. Ein weiterer Vorteil liegt in dem frühen Erkennen einer steigenden Seroprävalenz, wodurch die Einstufung in eine neue Kategorie ein bis zwei Monate früher erfolgen kann, was ebenso für die Bestandsbetreiber schnellere Handlungsmöglichkeiten ermöglicht. Dänische Schweineproduzenten sind inzwischen an der Schaffung einer Kategorie 0 interessiert, welche bei negativen Beständen eingeführt werden könnte und entscheidende Marktvorteile für das Fleisch bieten würde (ALBAN et al. 2002).

2.4.2 Deutschland

In Deutschland existieren zwei verschiedene Ansätze zum Salmonellenmonitoring.

Die Leitlinien für ein „Programm zur Reduzierung des Eintrages von Salmonellen durch Schlachtschweine in die Fleischgewinnung“ wurden nach einer 1996 durchgeführten Pilotstudie vom „Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten“ zusammen mit dem „Bundesministerium für Gesundheit“, den obersten Landesbehörden des Veterinärwesens und der Wirtschaft entwickelt (ANONYMUS 2006a; ANONYMUS 1998). Die Beprobung erfolgte nach einem bestimmten Schlüssel, die Untersuchung nach einer einheitlichen Methodik. Die Einführung in dieses Programm fand in zwei Phasen statt. In der ersten Phase erfolgte die Erhebung der Befunde und eine Orientierung über den

Belastungsgrad der Betriebe, wonach sie in der zweiten Phase in Kategorien eingestuft wurden. Die Leitlinien dienten als Maßnahme zum Verbraucherschutz und Erhaltung der Wettbewerbsfähigkeit. Die überwachten Betriebe konnten die Bezeichnung „salmonellenüberwachter Betrieb“ führen und somit ihre Wettbewerbsfähigkeit steigern. Es wurden keine staatlichen Mittel beigesteuert und die Teilnahme für Schlachthöfe und Schweineproduzenten war freiwillig. Die Leitlinien dienten als entscheidende Grundlage für die Etablierung des QS-Salmonellenmonitoring- und Bekämpfungsprogramms des QS-Systems.

2.4.2.1 QS - Programm

Im Jahre 2001 wurde die QS (Qualität und Sicherheit) GmbH gegründet. Sie stellte letztlich die Umsetzung der genannten Leitlinien dar. Organisationen und Verbände aller Stufen haben sich hierbei zusammengeschlossen. So finden Produktion, Verarbeitung und Vermarktung von Fleisch unter einem einheitlichen Zeichen statt. QS ist kein staatliches Zeichen, sondern orientiert sich mit seinem stufenübergreifenden System an den 2001 in der Regierungserklärung geforderten Gütesiegeln für die Landwirtschaft und einer gläsernen Produktion. Ziel ist es, das Vertrauen der Verbraucher durch eine Transparenz der Produktionsprozesse zu gewinnen. Die Qualitätssicherung erfolgt durch Dokumentation und Kontrolle auf allen Ebenen der Lebensmittelproduktion und Vermarktung. Für jede Stufe gelten dabei entsprechende Leitfäden. Die Kriterien des QS-Systems beinhalten zum einen die gesetzlichen Regelungen (Schweine-Salmonellen-Verordnung) und zum anderen darüber hinausgehende Anforderungen (ANONYMUS 2004b).

Im „*Leitfaden Salmonellenmonitoring*“ werden grundsätzliche Inhalte, wie Zielsetzung, Geltungsbereich, Verantwortlichkeit, Vorgehensweise und zu ergreifende Maßnahmen beschrieben. Kernelement des Salmonellenmonitorings ist die zentrale Datenbank „Qualiproof“. Dabei werden die Stammdaten der Betriebe von Bündlern in die Datenbank eingegeben. Dadurch werden Kontinuität und Vollständigkeit der Proben geprüft. Anschließend werden die Daten ausgewertet und die Betriebe in Salmonellenkategorien eingestuft (ANONYMUS 2006). Die Landwirte haben Zugriff auf die eigenen Daten und auch dem betreuenden Tierarzt ist eine Freischaltung für die Datenbank möglich. Die Probennahme erfolgt zum einen mittels Fleischsaftproben im Schlachtbetrieb. Dabei wird der Fleischsaft aus Zwerchfellspfeilerproben oder anderen geeigneten Muskellokalisationen (Kehlgangsbereich, Nackenmuskulatur) gewonnen. Diese müssen sehnenfrei und sichtbar frei

von Blutresten sein und dürfen max. 3 Wochen im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt werden. Zum anderen ist ebenso die Entnahme von Blutproben im landwirtschaftlichen Betrieb frühestens 2 Wochen vor geplanter Schlachtung möglich. Anschließend werden die Proben mit Registriernummer, Probenentnahmedatum, Probennummer und Labor-Identifizierung gekennzeichnet und nur an QS anerkannte Labore zur Untersuchung versandt. Dort erfolgt dann die Untersuchung mittels QS anerkannter ELISA-Testsysteme. Dabei handelt es sich um validierte und durch das „Friedrich-Löffler-Institut“ zugelassene Testsysteme mit spezifischen Cutoff-Werten und Kontrollseren. Die Kategorisierung geschieht aufgrund prozentualer Prävalenzstufen der Stichproben (siehe Tabelle 2). Bei Beständen in Kategorie III werden Maßnahmen zur Senkung der Belastung durch Salmonellen ergriffen. Der Tierarzt fungiert dabei als Berater für den Landwirt. Er sorgt für eine Erörterung und Umsetzung der Maßnahmen zur Reduktion der Salmonellenbelastung. Es erfolgt eine Bestandsaufnahme möglicher Eintragsquellen und der Dynamik der Infektion. Dies geschieht stichprobenartig durch bakteriologische Untersuchungen mittels Rektal- oder Analtupfern oder Sammelkotproben. Auch andere Eintragsquellen, wie Futtermittel, Schädlinge, Haustiere, Trinkwasser oder Maßnahmen des allgemeinen Betriebsablaufes (Personenverkehr, Schutzkleidung, Fahrzeugverkehr, Kadaverlagerung) werden kontrolliert. Darüber hinaus werden auch Faktoren zur Aufrechterhaltung und Verbreitung der Salmonellen im Bestand identifiziert. Anschließend werden Maßnahmen zur schrittweisen Reduktion der Salmonellenbelastung getroffen. Es erfolgt eine Intensivierung der allgemeinen Sauberkeit und Hygiene. Zusätzliche Maßnahmen stellen das Ansäuern des Futters, eine Laktulosefütterung, eine Desinfektion des Trinkwassers oder Impfungen dar.

Während des Transportes zum Schlachthof wird vor allem darauf geachtet, dass der Kontakt von Schweinen aus unterschiedlichen Beständen und Salmonellen-Kategorien verhindert wird. Dabei werden Mastschweine grundsätzlich nur in gereinigten und desinfizierten Transportfahrzeugen transportiert. Auch beim Aufenthalt im Schlachthof gilt die Verhinderung des Kontaktes von Schweinen aus unterschiedlichen Beständen, wobei separate Buchten für Schweine aus Kategorie III gefordert werden. Tiere aus Beständen mit Kategorie III werden getrennt am Ende des Schlachttages oder nur an bestimmten Tagen unter besonderen Bedingungen geschlachtet, woran sich eine umfassende Reinigung und Desinfektion anschließt.

2.4.2.2 Schweine-Salmonellen-Verordnung

Da eine freiwillige Umsetzung des QS-Programms bisher nicht ausreichend gelang, wurde eine Bundesverordnung vom „BMVEL“ entworfen und am 13.März 2007 in Kraft gesetzt (BLAHA 2003b; PETERS 2002). Kernpunkt der neuen Schweine-Salmonellen-Verordnung ist, wie auch beim QS-Programm, die Untersuchungspflicht aller Betriebe, welche Mastschweine zur Schlachtung abgeben. Die Probenentnahme erfolgt entweder als Blutprobe im Schlachtbetrieb oder als Fleischsaftprobe im Schlachthof. Es werden gegen *Salmonella* gerichtete Antikörper untersucht. Die Anzahl der Proben richtet sich nach der Betriebsgröße und ist stichprobenartig über das ganze Jahr verteilt. Beispielsweise sind bei einem Betrieb mit mehr als 200 produzierten Schlachtschweinen pro Jahr, mindestens 60 Proben zu untersuchen. Die Untersuchungsstätten sind staatliche Untersuchungsämter, Institute von Landwirtschaftskammern oder private Laboratorien, welche an regelmäßigen Ringversuchen teilnehmen müssen und somit nach DIN 17025/2005 akkreditiert werden (LANGE und EHLERS 2002). Nach der Untersuchung werden die Ergebnisse dem Landwirt mitgeteilt, welcher diese dokumentieren und mindestens drei Jahre lang aufbewahren muss. Jedoch können die Daten ebenso über Koordinationsstellen kontrolliert werden. Dazu kommen z.B. eigens dafür gegründete Unternehmen, Schlachtunternehmen, Erzeugergemeinschaften, Landwirtschaftskammern oder auch das QS-System in Frage. Jeder Mastbestand erhält seinen Salmonellen-Status in Form einer Kategorisierung. Eine Einstufung in Kategorie III ist vom Landwirt der zuständigen Veterinärbehörde mitzuteilen. Die Eintragsquelle wird von dieser nun mittels bakteriologischer und epidemiologischer Untersuchungen auf Salmonellen abgeklärt. Des Weiteren wird eine umfassende Reinigung und Desinfektion der frei werdenden Buchten und Betriebsabteilungen sowie eine Schädnerbekämpfung angeordnet und überwacht.

Tabelle 1 . Stichprobenschlüssel zur Untersuchung der Schweinebestände auf Salmonellen. nach Anlage 1 (zu § 2 Abs. 1 und 2, § 4 Abs. 2 der Schweine-Salmonellen-Verordnung)

<u>Anzahl der voraussichtlich zur Schlachtung abgegebenen Schweine pro Jahr</u>	<u>Anzahl der zu untersuchenden Schweine</u>
weniger 45	25
45 bis 100	38
101 bis 200	47
mehr als 200	60

Tabelle 2. Einteilung der untersuchten Betriebe in Belastungskategorien. nach Anlage 2 (zu § 4 Abs. 2) der Schweine-Salmonellen-Verordnung

<u>Salmonellenantikörperstatus des Betriebes oder der Betriebsabteilung</u>	<u>Kategorie</u>	<u>Positive Befunde in der Stichprobe im vom Hundert</u>
Niedriger Status	I	0 bis 20
Mittlerer Status	II	Mehr als 20 bis 40
Hoher Status	III	Mehr als 40

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Das Ziel der Untersuchung stellte eine vergleichende Evaluierung von ELISA-Testsystemen zur serologischen Diagnostik von *Salmonella* Infantis Infektionen beim Schwein dar. In dem institutseigenen Tierversuchsstall wurden dazu salmonellenfreie Schweine aufgestellt. Diese wurden mit *S. Infantis* infiziert und über einen Zeitraum von 4 Monaten serologisch und bakteriologisch überwacht. Die serologische Untersuchung erfolgte mittels der vier in Deutschland zugelassenen ELISA-Testsysteme. Zum Ende des Versuchszeitraumes wurden die Probanden geschlachtet, wobei eine bakteriologische Untersuchung der diagnostisch wichtigen Organe und eine serologische Untersuchung des Fleischsaftes erfolgte.

3.2 Studienablauf

Es erfolgte die Einnistung von 19 salmonellenfreien ca. 4 Wochen alten Schweinen. Nach einer kurzen Eingewöhnungszeit wurden die Versuchstiere durch eine intragastrale Verabreichung einer *S. Infantis* Suspension, unter Sedation, infiziert. Um den Infektionsverlauf darstellen zu können, wurde die klinische Symptomatik über 14 Tage dokumentiert. Diese beinhaltete Allgemeinbefinden, Appetit, Körpertemperatur, Kotbeschaffenheit, Husten und Erbrechen. Hierbei wurde ein klinischer Score aufgestellt, bei dem keinerlei Auffälligkeiten mit 0, geringfügige Symptome mit 1, mittelgradige Symptome mit 2 und hochgradige Symptome mit 3 bewertet wurden. Somit war eine bessere vergleichende statistische Auswertung der gefundenen klinischen Symptomatik möglich. Gleichzeitig wurde das Körpergewicht bestimmt. Ebenso erfolgte, zur Dokumentation des Ausscheidungsverhaltens der Salmonellen mit dem Kot, in den ersten 10 Tagen eine quantitative Keimbestimmung der Salmonellen in den Faezes. In den ersten vier Wochen fand eine bakteriologische und serologische Kontrolle in einem Intervall von 3-4 Tagen statt, in den folgenden 12 Wochen dagegen einmal wöchentlich. Nach 21 Tagen erfolgte zur serologischen und bakteriologischen Kontrolle der Organe die Schlachtung von drei Tieren der Versuchsgruppe. Schließlich wurden die übrigen Versuchstiere nach einem Untersuchungszeitraum von 4 Monaten nach einer Elektrobetäubung geschlachtet. Dabei wurden Proben von jeweils 13 Organen für die bakteriologische Untersuchung und für die

Gewinnung des Fleischsaftes entnommen und parallel Endserum gewonnen. Alle Blutproben und ebenso die Fleischsaftproben wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten mittels der vier zu testenden ELISA-Systeme untersucht. Auf diese Weise fand eine Evaluierung der derzeit in Deutschland zugelassenen serologischen Systeme zur Salmonellendiagnostik beim Schwein im Verlauf einer *S. Infantis* Infektion statt.

Zu Beginn des Versuches erfolgte die Einstellung von 19 Tieren, von denen nach drei Wochen (21. Tag) 3 Tiere geschlachtet wurden. Am 39. Tag verstarb ein Tier bei der Probenentnahme, so dass anschließend noch 15 Probanden zur Verfügung standen. Zwischen dem 109. und 113. Versuchstag wurden mittels bakteriologischer Kotuntersuchung *S. Derby* positive Tiere ermittelt, worauf die Schlachtung aller verbliebenen Versuchstiere am 123. Tag (4 Monate nach Infektion) erfolgte. Nach bakterieller Untersuchung der Organ- und Kotproben wurden sieben *S. Infantis* positive Tiere ermittelt und acht mit *S. Derby* mischinfizierte Tiere. Diese acht *S. Derby* positiven Tiere wurden ab dem 95. Tag aus der Auswertung genommen. Dies bezieht sich sowohl auf die bakteriologische als auch auf die serologische Diagnostik. Dieser Zeitraum von 14 Tagen bis zum Feststellen des Auftretens der *S. Derby*-Infektion wurde als Sicherheitspanne gewählt, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

3.3 Tiere, Material und Methoden

3.3.1 Aufstallung und Tiere

Der in dieser Arbeit durchgeführte Infektionsversuch fand in einem vollklimatisierten Tierversuchsstall des Institutes für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt (Tierversuchsvorhaben 7/05 beim Regierungspräsidium Leipzig). Die Hybridschweine (Landrasse x Deutsches Edelschwein) des Lehr- und Versuchsguts der Landesanstalt für Landwirtschaft des Freistaates Sachsen in Köllitsch wurden vor der Einstellung serologisch mittels des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA (Fa. Labor Diagnostik Leipzig, LDL) auf Salmonellenantikörper untersucht. Ebenso erfolgte eine bakteriologische Untersuchung der Faezes auf Salmonellenfreiheit nach ISO 6579. Unmittelbar vor der Einstellung fand eine gründliche Reinigung und Desinfektion des Versuchsstalles statt. Anschließend wurden an 30 verschiedenen Stellen Tupferproben entnommen und bakteriologisch untersucht, um somit

den Erfolg der Desinfektion zu überprüfen. Um den Transport der Tiere möglichst stressfrei zu gestalten, wurden diese mit 0,4mg Azaperon (Stressnil[®], Fa. Jansen) pro Kilogramm Körpergewicht sediert. Nach der Einstellung der 19 Tiere erfolgten das Einziehen der Ohrmarken und die Entnahme der Präinfektionsproben von Kot und Serum. Ebenso wurden das Gewicht, die Körpertemperatur sowie der Allgemeinzustand der Probanden dokumentiert.

3.3.2 Experimentelle Infektion

Die Infektion der sechs Wochen alten Läufer erfolgte nach 3 Tagen Eingewöhnungszeit mittels einer Magenschlundsonde (Fa. Rüschi, Kern), wobei auch hier vorher eine Sedation der Tiere vorgenommen wurde. Jedem Schwein wurden 50 ml einer Salmonellenlösung mit 1×10^{10} KBE in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS, phosphat buffered saline) inokuliert. Hierzu wurde eine 3h-Kultur (Luria-Bertani-Bouillon) des *S. Infantis* Stammes Nummer 571/05 vom Nationalen Referenzlabor für Salmonelleninfektionen beim Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin verwendet. Dieses Isolat wurde aus einem Schwein mit Perikarditis, Peritonitis und Enteritis isoliert.



Abbildung 3. Experimentelle Infektion eines Schweins mit *Salmonella Infantis*. Die mit Stressnil[®] sedierten Schweine wurden oral via Magenschlundsonde mit einer Infektionsdosis von 1×10^{10} *S. Infantis* in einem Gesamtvolumen von 50 ml PBS infiziert.

3.3.3 Probengewinnung

3.3.3.1 Technik der Kotprobenentnahme

Die Kotproben wurden direkt aus dem Rektum des Tieres entnommen und in ein Röhrchen überführt. Das Probenbehältnis wurde mit der Ohrmarkennummer des jeweiligen Tieres und dem Untersuchungszeitpunkt gekennzeichnet.

3.3.3.2 Blutprobenentnahme

Die Entnahme der Blutproben erfolgte durch Punktion der *Vena cava cranialis* mittels Einmalkanülen (\varnothing/L 0,90x40, Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Als Probengefäße dienten Vacuetten[®] (Fa. Greiner bio-one, Essen). Durch Zentrifugation der Vacuetten[®] bei 4000 U/min für 10 Minuten wurde das Serum gewonnen, anschließend in 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Deckel (Fa. Eppendorf GmbH, Hamburg) pipettiert und bis zur serologischen Untersuchung bei -21°C eingefroren.

3.3.3.3 Organprobenentnahme

Die Organproben und die Proben für die Fleischsaftgewinnung wurden, nach Aufbruch des Tieres während der Schlachtung unter sterilen Kautelen mittels Einmalskalpellen, gewonnen. Anschließend wurde das Probenmaterial in sterile, beschriftete Petrischalen überführt. Es erfolgte die sofortige bakteriologische Bearbeitung des Organmaterials nach der Schlachtung.

3.3.4 Diagnostik von *Salmonella* spp.

3.3.4.1 Qualitativer Salmonellennachweis in Faezes und Organen

Die ISO-Norm 6579 fungierte als Grundlage für die kulturelle Diagnostik der *Salmonella* spp.. Das zuvor bei der Schlachtung steril entnommene Organmaterial wurde in Ethanol geschwenkt und daraufhin über einer offenen Gasflamme abgeflammt. Anschließend wurden 5g Probenmaterial in 45 ml Peptonwasser überführt und mittels Stomacher[®] 400 (Fa. Seward,

London, UK) auf höchster Stufe für zwei Minuten in einem Stomacher Beutel (Fa. Seward, London, UK) homogenisiert. Bei der Untersuchung der Kotproben der unterschiedlichen Versuchszeitpunkte wurden je 1g Kot in 9ml Peptonwasser überführt. Das entstandene Gemisch wurde jeweils für 24h bei 37 °C aerob bebrütet. Aus der Pepton-Voranreicherung wurden 100 µl entnommen, in halbfestes Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis überführt und anschließend bei 42°C für 24h aerob bebrütet. Nach 24h erfolgte eine erstmalige Auswertung, wobei Platten, bei den sich keine Schwärmzone gebildet hatte, nochmals für 24h in den Brutschrank verbracht und anschließend beurteilt wurden. Bei gebildeter Schwärmzone erfolgte in einer Doppelbestimmung der Ausstrich auf BPLS- und XLD-Medium und nachfolgend ebenso eine Bebrütung für 24h bei 37°C.

Objektträgerschnellagglutination

Mittels Objektträgerschnellagglutination (Agglutinationsseren der Fa. Sifin, Berlin) wurden anschließend verdächtig erscheinende Kolonien bestätigt und deren Serotyp identifiziert. Dabei wurde mittels einer Öse eine Kolonie in einem Tropfen omnivalentes Testserum suspendiert. Als Negativkontrolle erfolgte der gleiche Vorgang in einem Tropfen Kochsalzlösung. Der Objektträger wurde ca. 30 Sekunden geschwenkt und vor einem hellen Hintergrund auf eine Agglutination hin durchsucht, die für eine Antigen-Antikörper-Bindung sprechen würde. Im positiven Falle wurde durch die Nutzung weitere Seren die Gruppenzugehörigkeit ermittelt.

Tabelle 3. In dem Infektionsversuch mit *S. Infantis* untersuchte Organ- und Gewebeproben vom Schwein.

Gewebeprobe	Abkürzung
Tonsille	To
Mandibularlymphknoten	MaLy
Leber	Le
Milz	Mi
Jejunum	Je
Ileum	Il
Kolon	Co
Zaecum	Ca
Ileozökallymphknoten	Icly
Jejunallymphknoten	Jely
Kolonlymphknoten	Coly
Muskulatur	Mu
Gallenflüssigkeit	Gf

3.3.4.2 Quantitativer Salmonellennachweis in Faezes und Organen

Für den quantitativen Nachweis von Salmonellen in den Faezes wurden jeweils 1 g der frisch gesammelten Kotproben in je 9 ml gepuffertes Pepton-Wasser eingewogen und gut suspendiert. Von dieser Suspension wurden 25 µl im Dreifachansatz auf XLD⁺-Platten (versetzt mit 100µg/ml Chloramphenicol) ausgetropft. Weitere 25 µl wurden im Mikrotitersystem in 10er-Schritten verdünnt und ebenfalls auf XLD⁺-Platten überführt. Nach erfolgter Inkubation bei 37°C für 18-24 Stunden konnte die Keimzahl durch Auszählen bestimmt werden. Der quantitative Nachweis der Salmonellen in Organen und Geweben verlief analog. Hierbei erhielt man die nötige Proben für die XLD⁺-Platten jedoch aus der im Stomacher[®] hergestellten Suspension.

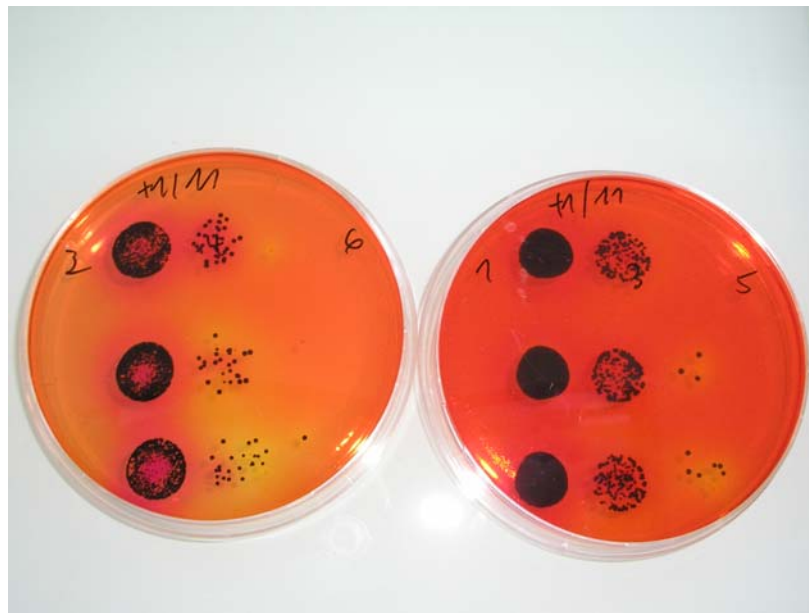


Abbildung 4. Quantitative Bestimmung von *S. infantis* (Kolonie bildende Einheiten, KBE) beim Schwein in den ersten 10 Tagen nach erfolgter Infektion.

3.3.4.3 Serologische Diagnostik

Die gewonnenen Seren wurden mittels der vier derzeit nach §17c Tierseuchen-Gesetz gültigen Testsysteme zur Salmonellendiagnostik untersucht. Dazu gehören der Salmotype[®] PigScreen[™] (Fa. Labor Diagnostik Leipzig, LDL), der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] (Fa. Idexx), das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] (Fa. Boehringer Ingelheim) und der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA (Fa. Labor Diagnostik Leipzig).

Die Tests wurden strikt anhand der Gebrauchsinformation des jeweiligen Herstellers mit den dazugehörigen Reagenzien durchgeführt.

Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] der Firma Labor Diagnostik Leipzig basiert auf der „Referenzstandard-Methode“, wobei eine isotypspezifische Detektion der IgM-, IgG- und IgA-Antikörper gegen Salmonellen erfolgte. Die Visualisierung geschah mittels TMB Substrat. Dabei besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Farbreaktion und dem Antikörpergehalt. Die Messung der Farbreaktion wurde anschließend durch ein computergesteuertes Photometer (Typ „Multiscan Ascent[®]“, Fa. LabSystem) bei einer Wellenlänge von 490 nm durchgeführt. Die Berechnungen für die Antikörperaktivitäten

erfolgten mittels einer speziell entwickelten Software Salmosoft™ (Fa. LDL). Die drei weiteren ELISAs, der Salmotype® Pig Screen™ (Fa. LDL), der HerdChek® Swine Salmonella™ (Fa. Idexx) und der Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ (Fa. Boehringer-Ingelheim) basieren auf der Bestimmung der optischen Dichte der Substratreaktion und dem prozentualen Anteil an einem positiven Referenzwert. Die Farbreaktion wurde nach dem gleichen Schema wie beim Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA der Firma Labor Diagnostik Leipzig ermittelt. Der angegebene Wert wurde in die, in der jeweiligen Gebrauchsanweisung angegebene, Formel eingesetzt und es konnte daraus der entsprechende OD%-Wert bestimmt werden. Anhand des Cutoff-Wertes nach dem QS-System (Qualität und Sicherheit GmbH) sowie der Cutoff-Werte der Hersteller wurden die Proben als negativ oder positiv beurteilt. Bei jedem Tier wurden 24 Blutproben (eine Präinfektionsprobe und 23 Blutproben nach der Infektion) und eine Fleischsaftprobe untersucht. Der Fleischsaft wurde aus einer ca. 10 g schweren Muskelprobe eines Zwechfellspfeilers gewonnen, welche tiefgefroren, später mehrmals aufgetaut und wiederholt eingefroren wurde. Der beim Auftauen entstandene Fleischsaft wurde aufgefangen und in einem Eppendorfgefäß bei -21°C bis zum Testbeginn gelagert.

3.4 Statistische Auswertung

Die Darstellung des Antikörpertiters unter Nutzung der vier verschiedenen ELISA-Tests erfolgte an den jeweiligen Versuchstagen mittels sogenannter „Notch-Boxen“ (*engl.* notch = Keil), einer graphischen Darstellungsform aus der deskriptiven Datenanalyse. Hierbei erfolgt die Abbildung des Median, des unteren und oberen Quartils (horizontale Begrenzung des Keils), der 95% Konfidenzgrenze (schräge Begrenzung der Figur) sowie der Extremwerte. Die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen erfolgte mittels des Student's *t*-Test, dem Test nach Welch sowie dem Test nach Man-Whitney. Hierbei wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinik

Die klinische Untersuchung der Versuchstiere (n=19) erfolgte in den ersten 14 Tagen *post infectionem* (*p.i.*) täglich. Dabei wurden die Parameter Allgemeinbefinden, Appetit, Atmung, Husten, Erbrechen und Durchfall anhand eines Scores untersucht. Dieser wurde in die Kategorien 0 (unverändert), 1 (geringgradig verschlechtert), 2 (mittelgradig verschlechtert) und 3 (hochgradig verschlechtert) unterteilt.

Alle Tiere wiesen nach der experimentellen Infektion mit *S. Infantis* eine gastroenteritische Klinik auf. So wurde bereits sieben Stunden nach der Infektion bei einigen der Tiere (n=7) Erbrechen festgestellt.

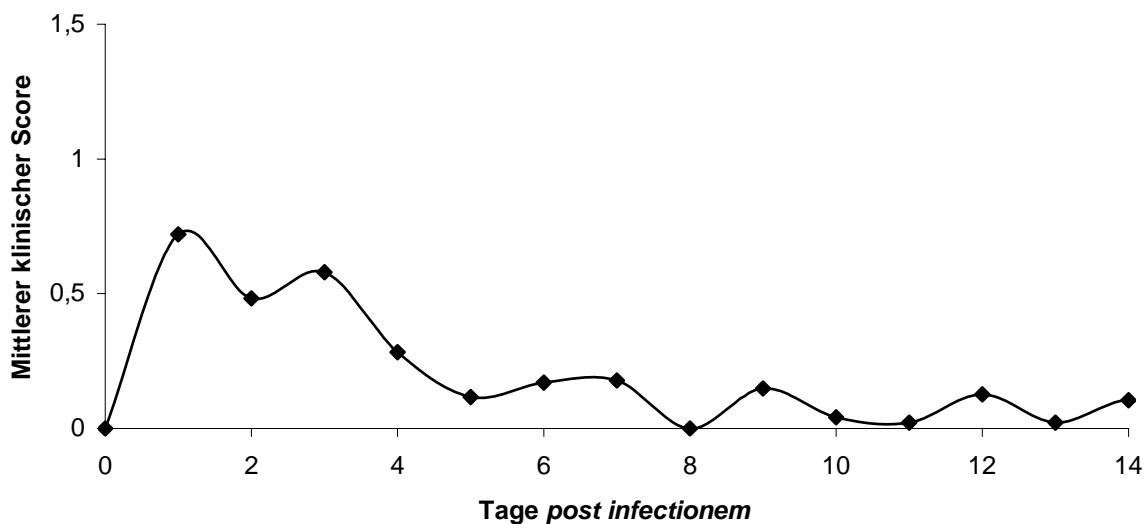


Abbildung 5. Mittlerer klinischer Score in den ersten 14 Tagen nach experimenteller Infektion mit *S. Infantis* beim Schwein. x-Achse (Tage *p.i.*), y-Achse (0 = unverändert, 1 = ggr. verändert, 2 = mgr. verändert, 3 = hgr. verändert).

Für den mittleren klinischen Score wurden die Parameter Allgemeinbefinden, Appetit, Atmung, Husten und Erbrechen herangezogen. In Abbildung 5 ist ersichtlich, dass nur geringgradige klinische Veränderungen vorlagen. Die Spitzenwerte ergaben sich durch Einzeltiere, bei welchen zum Teil starke klinische Symptome in Form von Erbrechen oder Atemproblemen auftraten.

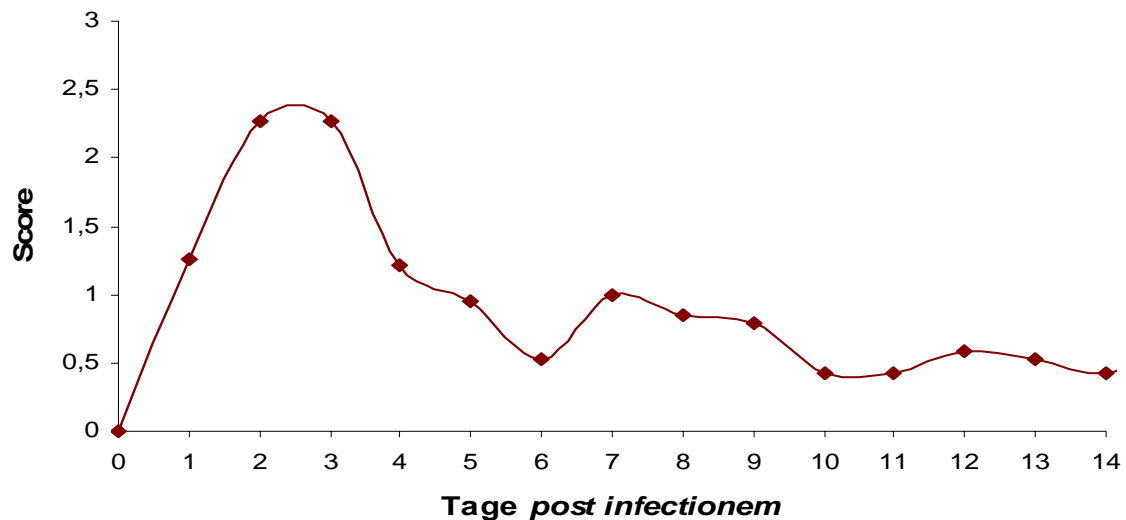


Abbildung 6. Verlauf des Durchfallgeschehens über einen Zeitraum von 14 Tagen nach experimenteller *S. Infantis* Infektion beim Schwein. Score Kotkonsistenz: unverändert (0), geringgradig verändert (1), mittelgradig verändert (2), hochgradig verändert (3).

In Abbildung 6 ist ersichtlich, dass schon am ersten Tag *p.i.* eine deutliche Verringerung der Kotkonsistenz vorlag. Am zweiten und dritten Tag *p.i.* zeigten dann alle Versuchstiere eine mittel- bis hochgradige Diarrhoe (Score 2-3) mit meist profusen Durchfall (Abbildung 7). Anschließend kam es zur Besserung des klinischen Bildes und es entwickelte sich eine intermittierend geringgradige Symptomatik. Nur einzelne Tiere wiesen bis zum neunten Tag *p.i.* eine mittelgradig veränderte Kotkonsistenz auf. Am Ende des 14-tägigen klinischen Beobachtungszeitraumes waren alle Tiere ohne Durchfallsymptome.



Abbildung 7. Konsistenz der Faezes zwei Tage *p.i.* nach experimenteller *S. Infantis* Infektion beim Schwein.

4.2 *Salmonella*-Diagnostik

4.2.1 Bakteriologische Diagnostik

4.2.1.1 Quantitativer Nachweis von *S. Infantis* in Faecesproben

In den ersten 10 Tagen nach der Infektion wurden von allen Tieren Kotproben entnommen und auf die Anzahl Kolonie bildender Einheiten (KBE) pro Gramm Kot untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 (S. 42) dargestellt.

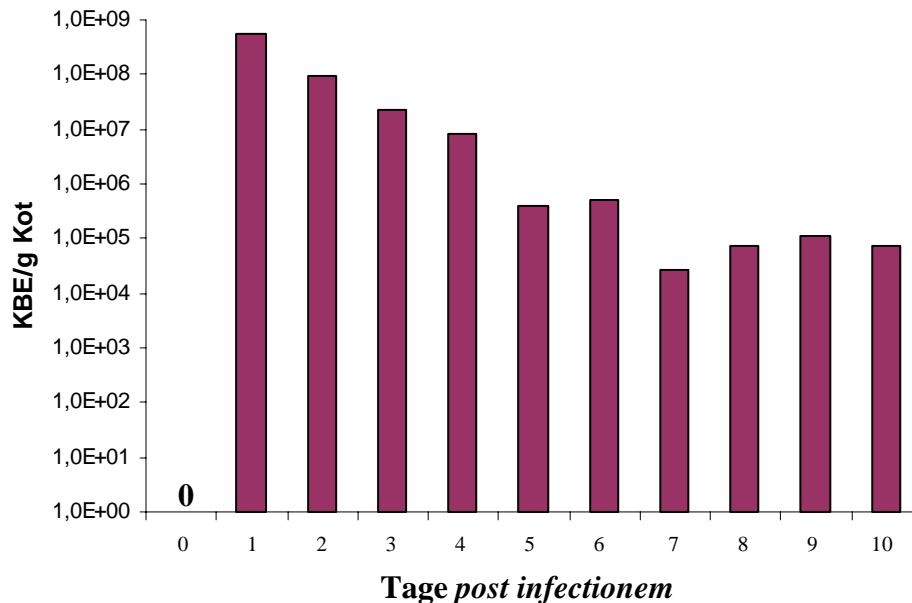


Abbildung 8. Quantitativer Nachweis von *S. Infantis* in den Faezes experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine während der ersten 10 Untersuchungstage. 0 = kein quantitativer Nachweis.

Bereits einen Tag nach der Infektion waren $5,4E+08$ KBE pro Gramm Kot nachweisbar.

Anschließend konnte bis zum fünften Tag *p.i.* ein nahezu linearer Abfall auf $4,0E+05$ KBE/g Kot festgestellt werden, während die Anzahl koloniebildender Einheiten im Anschluss auf annähernd gleichem Niveau verharrte. Dabei schieden jedoch meist alle Tiere direkt (d.h. ohne Voranreicherung) nachweisbar den Infektionsstamm aus.

4.2.1.2 Qualitativer Nachweis von *S. Infantis* in Faezesproben

Die Untersuchung der Kotproben auf *S. Infantis* erfolgte in Anlehnung an die ISO 6579. Sie diente der Ermittlung der Ausscheidungsrate von *S. Infantis* bei den experimentell mit *S. Infantis* infizierten Tieren. In Abbildung 9 ist die Ausscheidungsrate von *S. Infantis* im Versuchsbestand dargestellt. In den ersten 16 Tagen nach der Infektion schieden 100% der Probanden *S. Infantis* aus. Anschließend zeigten die Versuchstiere bis zum 102. Tag *p.i.* eine undulierende Salmonellenausscheidung, wobei die Ausscheidungsrate insgesamt jedoch geringer wurde. So waren am 22.Tag *p.i.* bei nur noch 80% der Tiere Salmonellen im Kot nachweisbar, am 25.Tag *p.i.* jedoch wieder 100%. Ein weiteres Absinken der Nachweisrate vollzog sich am 28. und 32. Tag *p.i.* (62-68%), worauf am 39. Tag *p.i.* jedoch wieder ein Anstieg auf 93,8 % zu verzeichnen war. Über den gesamten Versuchszeitraum von 123 Tagen (4 Monate) wurde *S. Infantis* nach der experimentellen Infektion von allen Versuchstieren ausgeschieden.

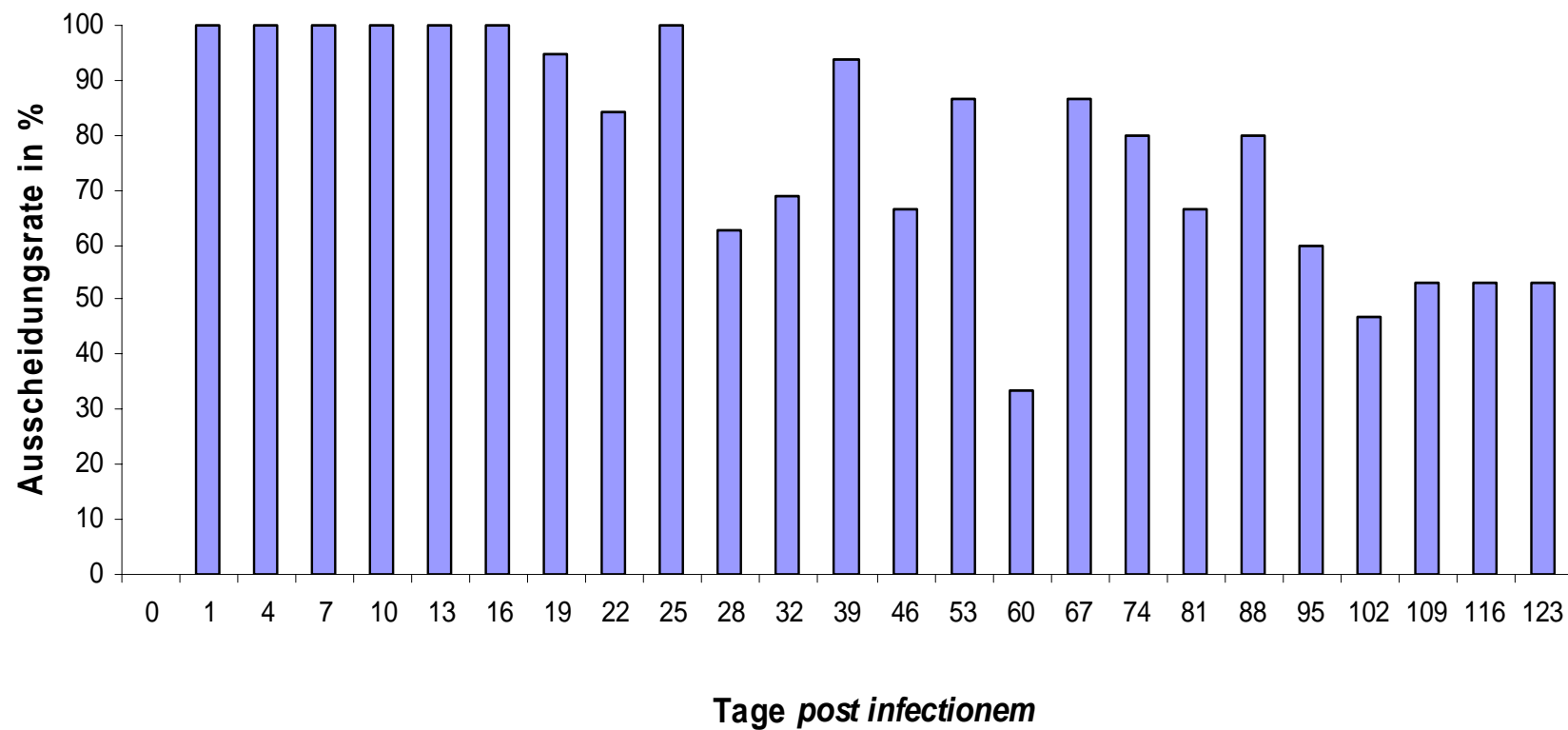


Abbildung 9. Ausscheidungsrate von *S. Infantis* in den Faezes experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine über dem gesamten Versuchszeitraum von 123 Tagen. Die Probenentnahmen erfolgten einmal wöchentlich.

4.2.1.3 Quantitativer Nachweis von *S. Infantis* in Organ- und Gewebeproben

Nach der Schlachtung wurden die Tonsillen, Mandibularlymphknoten, Leber, Milz, das Jejunum, die Jejunallymphknoten, das Ileum, die Ileozökallymphknoten, das Zaecum, Kolon, die Kolonlymphknoten, die Muskelproben und Gallenflüssigkeit von allen Versuchstieren (n=8) unter sterilen Bedingungen entnommen und auf die Anzahl Kolonie bildender Einheiten pro Gramm Gewebe untersucht.

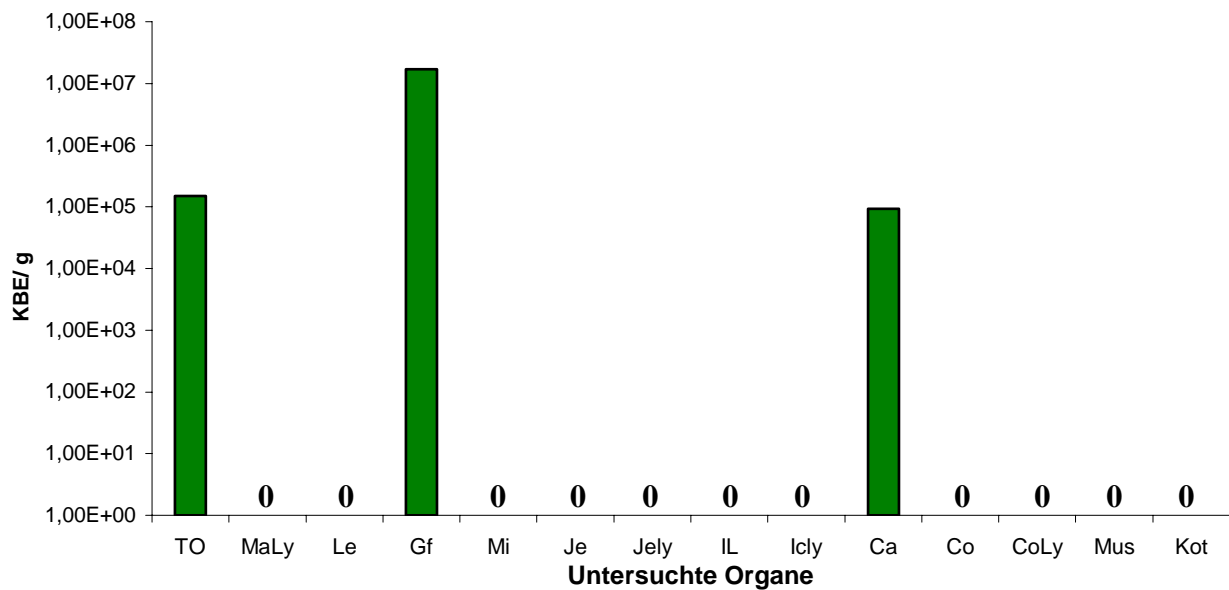


Abbildung 10: Quantitativer Nachweis von *S. Infantis* in Organen und Geweben experimentell infizierter Schweine. Tonsille (TO), Mandibularlymphknoten (Maly), Leber (Le), Milz (Mi), Jejunum (Je), Jejunallymphknoten (Jely), Ileum (Il), Ileozökallymphknoten (Icly), Zaecum (Ca), Kolon (Co), Kolonlymphknoten (Coly), Muskel (Mus), Gallenflüssigkeit (Gf). 0 = kein quantitativer Nachweis.

Eine Quantifizierung von Salmonellen war nur in der Tonsille, im Zaecum und in der Gallenflüssigkeit möglich. Der höchste Gehalt konnte mit $2,0E+0,7$ KBE/g in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden. In den anderen Organen ließen sich ohne vorherige Anreicherung keine Salmonellen nachweisen (Abbildung 10).

In der Einzeltierstatistik wurde ersichtlich, dass nur bei drei von sieben *S. Infantis* positiven Tieren (42,9%) Kolonie bildende Einheiten in der Tonsille nachgewiesen werden konnten. Nur 28,6% (2 von 7) der *S. Infantis* positiven Tiere wiesen *S. Infantis* im Zaecum auf, während nur eines von sieben Tieren (14,3%) Salmonellen in der Gallenflüssigkeit zeigte.

4.2.1.4 Qualitativer Nachweis von *S. Infantis* in Organ- und Faezesproben

Die qualitative Untersuchung auf *S. Infantis* in Gewebeproben erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die ISO 6579.

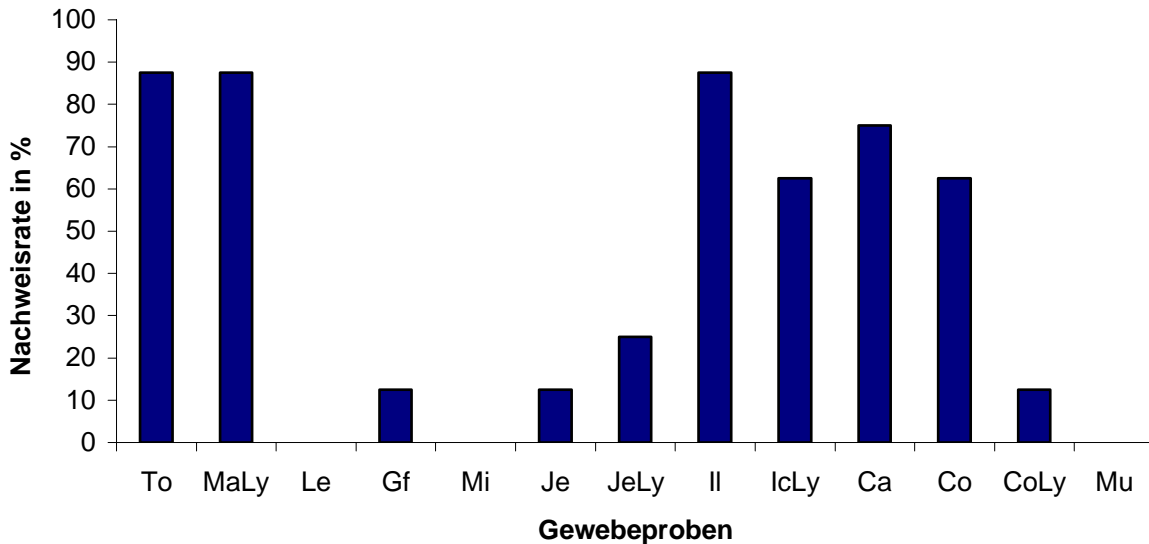


Abbildung 11: Nachweisrate von *S. Infantis* in Gewebeproben experimentell infizierter Schweine. Tonsille (TO), Mandibularlymphknoten (Maly), Leber (Le), Milz (Mi), Jejunum (Je), Jejunallymphknoten (Jely), Ileum (Il), Ileozökallymphknoten (Icly), Zaecum (Ca), Kolon (Co), Kolonlymphknoten (Coly), Muskel (Mus), Gallenflüssigkeit (Gf). 0 = keine Salmonellen nachweisbar.

Bei keinem der *S. Infantis* positiven Probanden konnten Kolonien in der Leber, der Milz oder im Muskel nachgewiesen werden. Bei 85,7 % der Tiere ließen sich Salmonellen in der Tonsille, den Mandibularlymphknoten und im Ileum diagnostizieren. 71,43% der Tiere zeigten *S. Infantis* im Zaecum. Im Ileozökallymphknoten und Kolon konnten bei 57,14% der Tiere, Salmonellen nachgewiesen werden. Im Jejunallymphknoten wurde eine Rate von 28,6% nachgewiesen. Im Jejunum, in den Kolonlymphknoten und in der Gallenflüssigkeit ließen sich bei der geringsten Anzahl der Tiere (14,3%) Salmonellen diagnostizieren (Abbildung 11).

4.2.2 Serologischer Nachweis

Der serologische Nachweis von *S. Infantis* wurde mit den vier derzeit nach §17c des TSeuchG zugelassenen indirekten ELISA-Testsystemen durchgeführt. Dazu gehörte das isotypspezifische, auf einem Vollzellextrakt von *S. Typhimurium* basierende, ELISA-System Salmotype® Pig STM-WCE™ der Fa. Labor Diagnostik Leipzig. Hierbei wurden die Antikörperaktivitäten der Isotypen IgA, IgM und IgG im Verlauf der Infektion ermittelt. Neben diesem ELISA-System wurden noch drei isotypunspezifische, auf LPS-basierende ELISA-Systeme, der Salmotype® PigScreen™ der Fa. Labor Diagnostik Leipzig, der HerdChek® Swine Salmonella™ der Fa. Idexx und das Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ der Fa. Boehringer-Ingelheim, vergleichend eingesetzt. Über einen Zeitraum von 123 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben von allen Versuchstieren entnommen und mit den vier oben genannten Testsystemen vergleichend untersucht.

4.2.2.1 Vergleich des Antikörpertiterverlaufs der Isotypen IgM, IgA und IgG mittels Salmotype® Pig STM-WCE™

Mit dem ELISA-System Salmotype® Pig STM-WCE™ wurden über einen Zeitraum von 123 Tagen die Titerverläufe der Isotypen IgA, IgM und IgG bestimmt (Abbildung 12). Die Cutoff-Werte der verschiedenen Isotypen lagen für IgM bei 66 ELISA Units (E.U.), für IgA bei 34 E.U. und für IgG bei 58 E.U..

Bei Betrachtung des gesamten Titerverlaufes über den Versuchszeitraum fällt ein wellenförmiger Verlauf der Antikörperaktivitäten auf. Vom ersten bis zum zehnten Tag *p.i.* ist ein Anstieg zu erkennen, dem sich bis zum 16. Tag *p.i.* ein Abfall anschließt. Vom 19. bis zum 28. Tag *p.i.* ist wiederum ein leichter Anstieg auffällig, welcher bis zum 39. Tag *p.i.* wieder absinkt. Die nächste Welle schließt sich ab dem 46. bis zum 89. Tag *p.i.* und die vierte vom 94. Tag *p.i.* bis zum Ende des Infektionsversuches an.

Vom ersten bis zum 16. Tag nach der Infektion lag der IgG-Antikörperspiegel meist signifikant höher als der von IgA und IgM. Am vierten Tag *p.i.* waren bereits 25% der Versuchstiere IgG positiv. Der 10. Tag *p.i.* stellte mit 100% IgG-positiven Tieren den Höhepunkt der ersten Welle im Gesamtverlauf dar. Am 13. und 16. Tag *p.i.* sank der IgG-Antikörperspiegel und keines der Tiere im Versuchsbestand wurde als IgG-positiv erkannt. In dieser ersten Welle stieg der Antikörperspiegel von IgA nur bei vereinzelt Tieren im geringen Maße an, jedoch wurde keines der Tiere als positiv beurteilt. Als am 10. Tag *p.i.* über

25% der Tiere als IgM-positiv gewertet wurden, spiegelte sich am 13. Tag *p.i.* auch in dem absinkenden IgM-Antikörperspiegel der wellenförmige Verlauf wider. In der zweiten feststellbaren Welle der Antikörperantwort wurden vom 19. bis 39. Tag *p.i.* bis auf Einzeltiere kaum Probanden IgA-positiv gewertet. Während am 25. Tag *p.i.* alle Tiere als IgG-positiv erkannt wurden, sank der IgG-Spiegel bis zum 39. Tag *p.i.* wieder ab und es wurden zunehmend weniger Tiere positiv gewertet. Auch wurden vom 25. bis zum 32. Tag *p.i.* zunehmend mehr Tiere als IgM-positiv gewertet, wobei am 39. Tag *p.i.* wiederum alle Probanden im negativen Bereich für spezifisches IgM lagen.

Auch vom 46. bis zum 60. Tag *p.i.* lagen die IgM- und IgG-Titer signifikant höher als die IgA-Titer. IgA reagierte kaum positiv. In der dritten Welle wurden am 53. Tag *p.i.* fast alle Tiere IgG-positiv beurteilt, während am 60. Tag *p.i.* wiederum keines der Versuchstiere einen positiven Titer zeigte. IgM folgte dieser Welle mit ähnlichem Verlauf, aber niedrigerem Titer Spiegel. IgA zeigte am 81. und 88. Tag *p.i.* weit über 25% der Tiere als positiv an. Am 94. Tag *p.i.* betraf dies jedoch abermals nur Einzeltiere. Ein Großteil der Tiere wurde jedoch als IgG-positiv gewertet, wobei dies am 81. und 94. Tag *p.i.* alle Tiere betraf. In diesem Zeitraum wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt auch alle Tiere IgM-positiv beurteilt, wobei Spitzenwerte mit über 400 ELISA-Units erreicht wurden und IgM signifikant höher als IgA und IgG lag. Auch IgG zeigte einen signifikant höheren Antikörperspiegel als IgA. Im Endserum wurden mehr als 75% der Tiere IgG- und IgM-positiv gewertet. Dabei lagen beide Isotypen signifikant höher als IgA, für das keines der Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung positiv war.

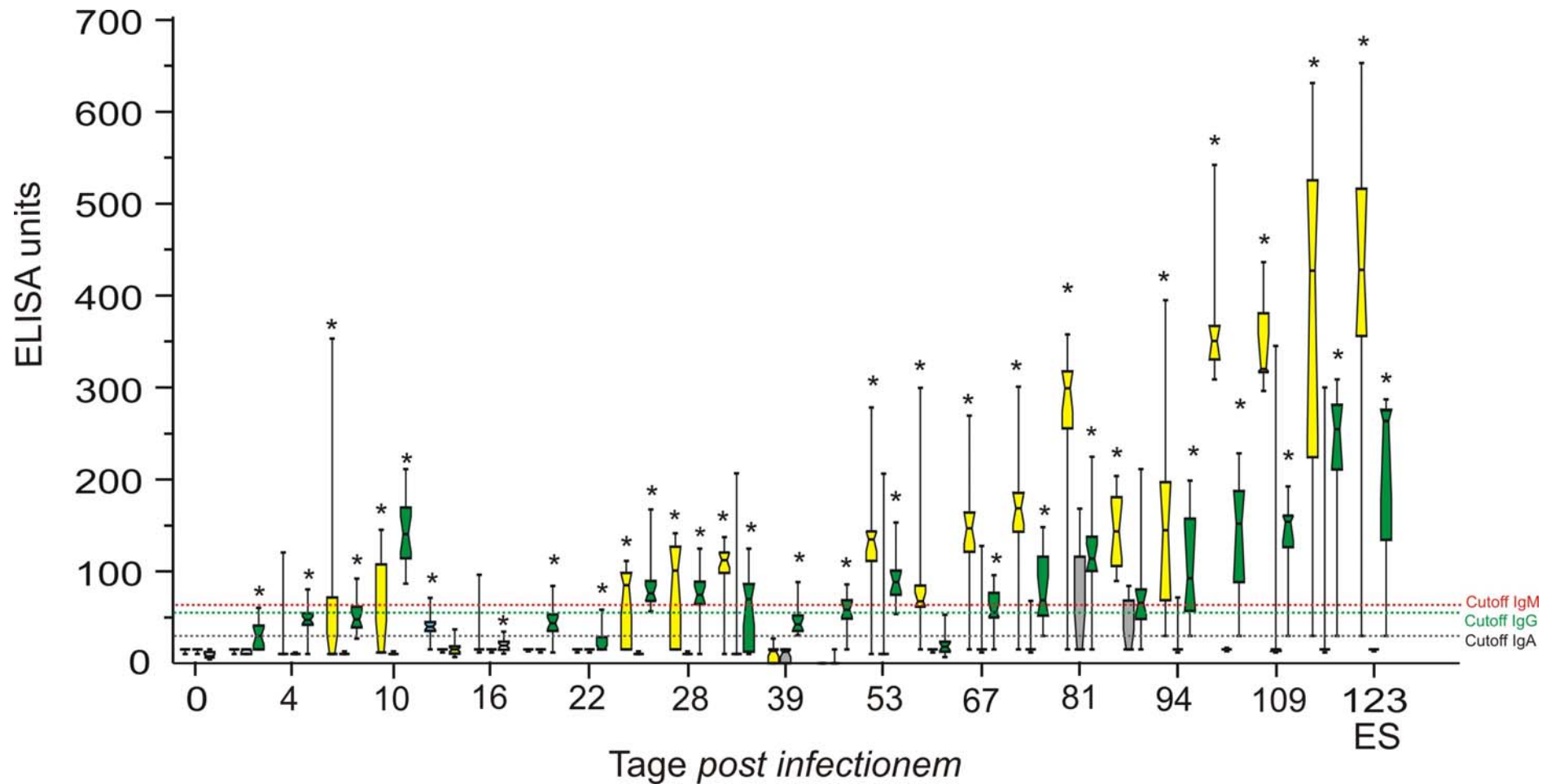


Abbildung 12. Isotypspezifische Antikörperaktivitäten im Blutserum experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine. Zum Einsatz kam der Test Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA. IgM (gelb), IgA (grau), IgG (grün), * (p<0,05).

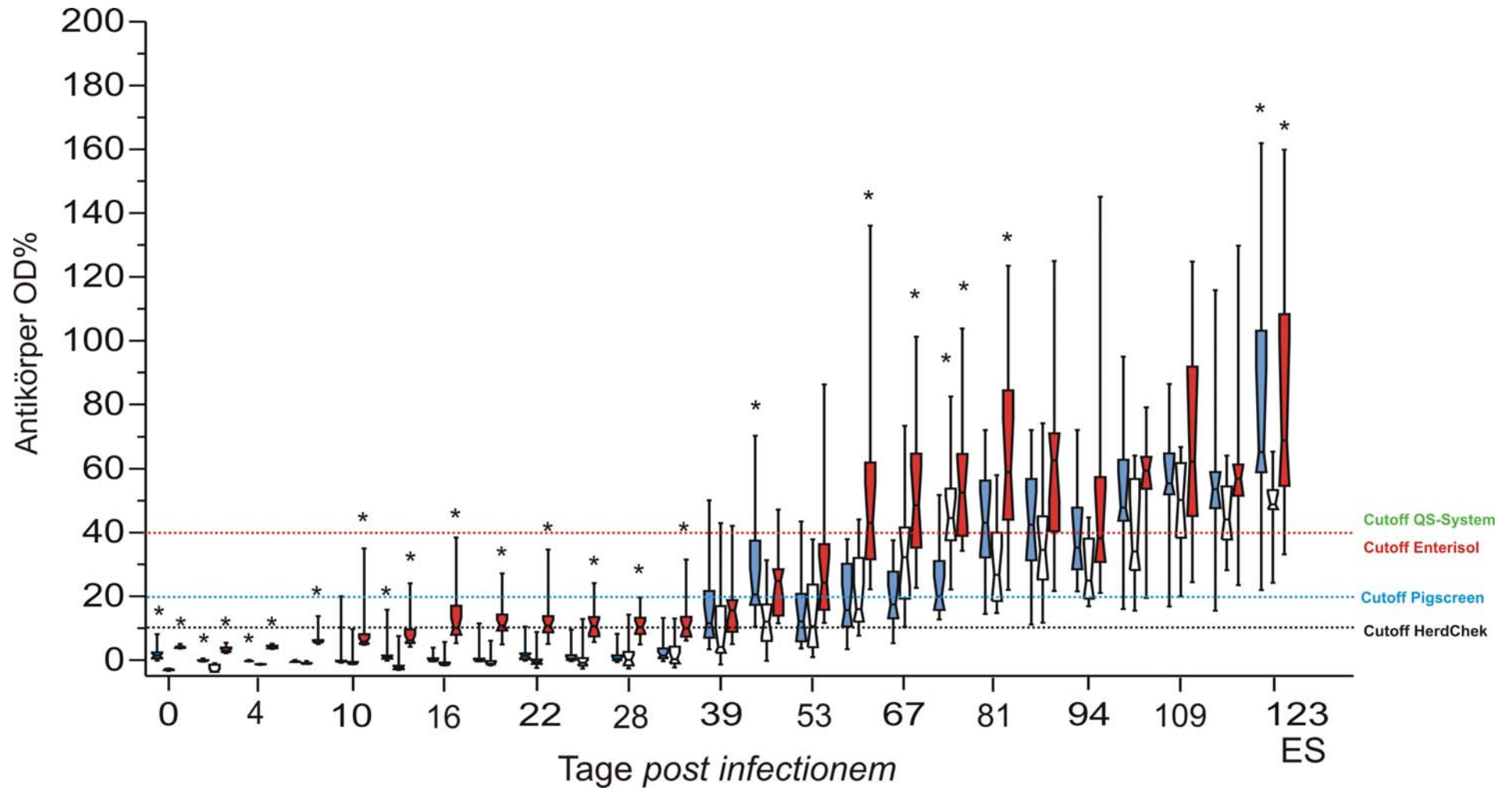


Abbildung 13. Vergleich der Antikörperantworten im Blutserum experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine anhand der drei in Deutschland für die Salmonellendiagnostik zugelassenen LPS-ELISA-Systeme. Salmotype® PigScreen™ (blau), Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ (rot), HerdChek® Swine Salmonella™ (weiß), * ($p < 0,05$).

4.2.2.2 Vergleichender isotypenspezifischer Titerverlauf der ELISA-Systeme Salmotype[®] PigScreen[™], HerdChek[®] Swine Salmonella[™] und Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™]

In der Abbildung 13 sind die Titerverläufe der drei Testsysteme Salmotype[®] PigScreen[™] (Fa. Labor Diagnostik Leipzig), HerdChek[®] Swine Salmonella[™] (Fa. Idexx) und Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] (Fa. Boehringer-Ingelheim) dargestellt. Parallel zur x-Achse sind die testinternen Cutoff-Werte (Test-Cutoff) und der nach QS-System gültige Cutoff (QS-Cutoff) von 40 OD% eingetragen. Beim Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] (Fa. Boehringer-Ingelheim) entspricht der Test-Cutoff dem QS-Cutoff. Die y-Achse stellt den Parameter Antikörper OD% dar, der sich aus der optischen Dichte (OD) der zu untersuchenden Probe verglichen mit der OD des Positivstandards errechnet (OD%). Übertrifft dieser Prozentsatz einen bestimmten Wert (Cutoff) wird die Probe positiv bewertet.

Auch bei den LPS-basierten ELISA-Systemen fällt im Gesamtüberblick ein undulierender Verlauf auf. Vom 7. bis zum 32. Tag *p.i.* wies das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] dabei durchweg signifikant höhere Antikörper-Titer auf als der Salmotype[®] PigScreen[™] oder HerdChek[®] Swine Salmonella[™]. Jedoch wurden mit diesem Test bis zu diesem Tag keine Tiere nach QS-Cutoff oder nach Test-Cutoff als positiv gewertet. Bis zum 32. Tag *p.i.* wurden alle Tiere von jedem Test nach QS-Cutoff als negativ eingestuft.

Der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] ist der erste Test, welcher unter Anwendung des Test-Cutoff von 10 OD% einen Teil der Probanden als positiv beurteilt. Von diesem Zeitpunkt an waren beim HerdChek[®] Swine Salmonella[™] immer ein Großteil positive Tiere zu verzeichnen.

Vom 39. bis zum 53. Tag ist eine kleine Welle im Antikörpertiterverlauf ersichtlich. Am 46. Tag erkannte dann der Salmotype[®] PigScreen[™] signifikant höhere Antikörper als die anderen beiden Tests und beurteilte über 50% der Versuchstiere als positiv. Lediglich das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] lag aufgrund seines hohen Cutoff-Wertes noch zum großen Teil im negativen Bereich. Am 39. Tag wurden erstmals Einzeltiere mit allen drei Tests mittels QS-Cutoff positiv gewertet. Ab dem 60. Tag blieb der mittels Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] erkannte Antikörpertiter signifikant höher als bei den anderen beiden Tests. Ab dem 67. Tag verzeichnete der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] schließlich mittels Test-Cutoff alle Tiere als positiv. Nach QS-Cutoff wurden jedoch erst ab dem 109. Tag *p.i.* der größte Teil der Tiere als *Salmonella*-infiziert erkannt.

Ab dem 81. Tag wertete auch der Salmotype[®] PigScreen[™] mittels Test-Cutoff fast alle Tiere als *Salmonella*-positiv, nach QS-Cutoff jedoch ca. 60%, bis schließlich ab Tag 102 *p.i.* der größte Teil der Tiere identifiziert wurde. Zu keinem Zeitpunkt wurden alle Tiere mittels QS-Cutoff von einem der Tests als *Salmonella*-infiziert erkannt. Im Endserum wurden mit allen drei Tests über 75 % der Tiere positiv gewertet, wobei die Antikörper-Titer von Salmotype[®] PigScreen[™] und Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] signifikant höher als die vom HerdChek[®] Swine Salmonella[™] lagen.

4.2.2.3 Vergleich des Antikörpertiterverlaufes mit allen vier ELISA-Testsystemen in Endserum und Fleischsaft

In Abbildung 14 ist ersichtlich, dass die Antikörperaktivitäten der Isotypen IgA, IgM und IgG des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] im Fleischsaft signifikant höher als im Endserum lagen. Zwischen den drei LPS-ELISA-Systemen hingegen waren im Endserum und im Fleischsaft keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

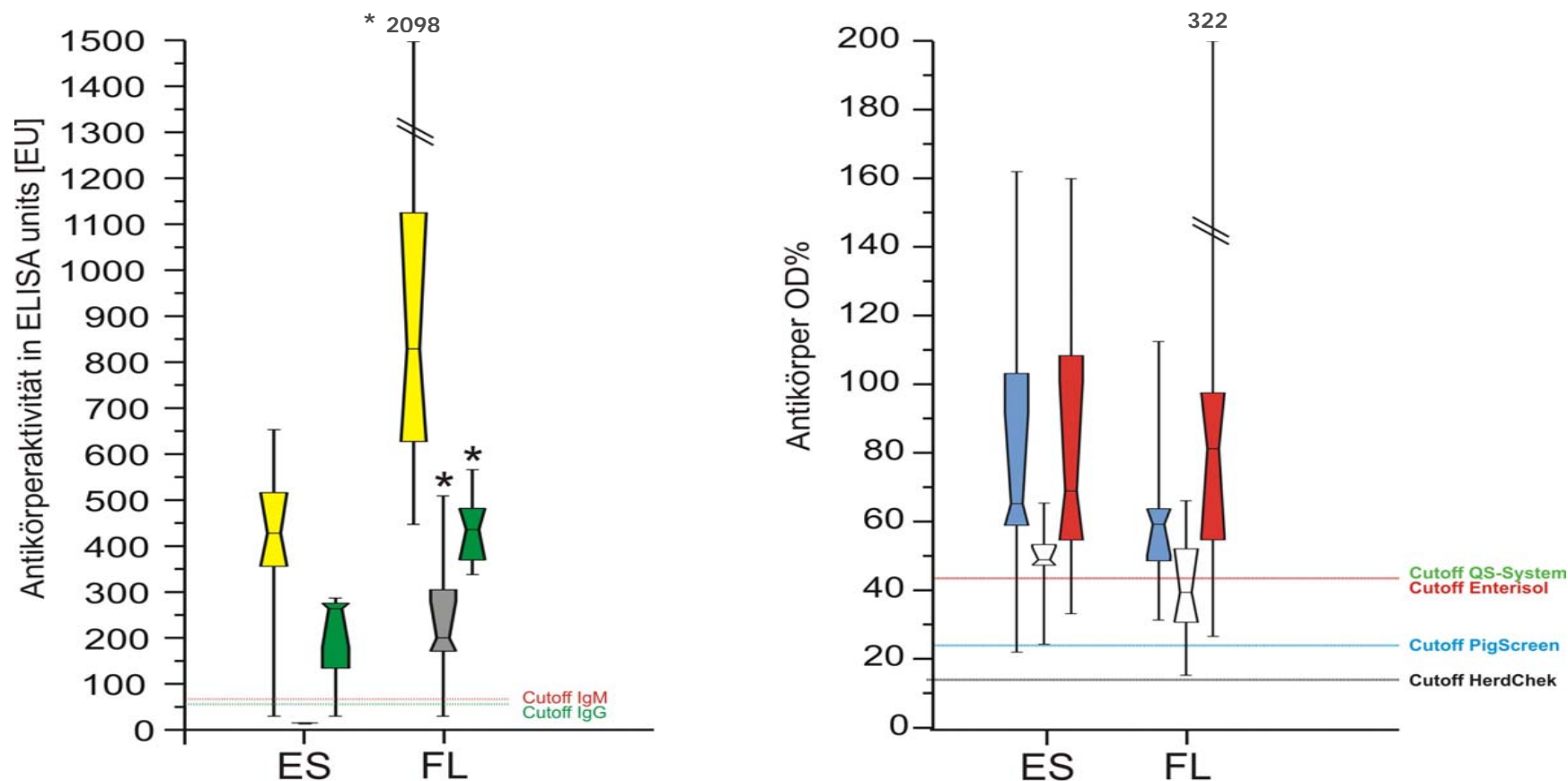


Abbildung 14. Vergleich der Antikörperantworten im Endserum und im Fleischsaft experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine mittels dem isotypspezifischen Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA und den drei in Deutschland zugelassenen LPS-ELISA. Links: IgM (gelb), IgA (grau), IgG (grün) des Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA; rechts: Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ (rot), Salmotype® PigScreen™ (blau), HerdChek® Swine Salmonella™ (weiß), * = (p<0,05).

4.2.2.4 Sensitivitäten der einzelnen ELISA-Testsysteme

4.2.2.4.1 Salmotype[®] Pig STM-WCE[™]

4.2.2.4.1.1 Sensitivitäten der einzelnen Isotypen

In den folgenden Abbildungen sind die ermittelten Sensitivitäten des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] in Bezug auf die einzelnen Isotypen dargestellt. In der ersten Abbildung wurde dabei jeweils die Sensitivität des Tests auf alle infizierten Tiere bezogen. In der jeweils zweiten Abbildung wurden nur die Tiere berücksichtigt, die am jeweiligen Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden. In einer dritten Abbildung wurden dann nochmals beide Graphen im Vergleich dargestellt. Im Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] entsprechen die verwendeten Cutoff-Werte des Testsystems für die Positivbewertung denen, welche nach QS-System vorgeschrieben sind.

Isotyp IgM

Die Abbildung 15 stellt die Sensitivität des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] für den Isotyp IgM für alle mit *S. Infantis* infizierten Tiere dar. Man erkennt einen undulierenden Verlauf der Test-Sensitivität, welcher sich über den gesamten Probenentnahmezeitraum erstreckte.

Bereits ab dem 4. Tag *p.i.* erkannte der Test einige der positiven Tiere (5,3%), dies steigerte sich bis zum 10. Tag *p.i.* auf 36,8%. Zwischen dem 13. und 22. Tag *p.i.* wurden jedoch kaum Tiere als positiv erkannt. Zwischen dem 25. und 32. Tag *p.i.* erreichte die Sensitivität wiederum Werte bis 81,3%. Nachdem am 39. und 46. Tag *p.i.* abermals keine Tiere als IgM-positiv erkannt wurden, stieg die Sensitivität bis zum 88. Tag *p.i.* bis auf 100%, welche auch am 102., 109. Tag *p.i.* und mittels Fleischsaft am 123. Tag *p.i.* erreicht wurde. Während im Fleischsaft alle Tiere als positiv erkannt wurden, detektierte der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] im Endserum nur 85,7% der Tiere.

In Abbildung 16, welche die Sensitivität des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] für den Isotyp IgM aller Tiere darstellt, welche *S. Infantis* an dem jeweiligen Tag mit den Faezes ausschieden, sind im Vergleich zu Abbildung 15, nur geringe Abweichungen zu erkennen. Dies war auch bei allen nachfolgend beschriebenen ELISA-Systemen sichtbar.

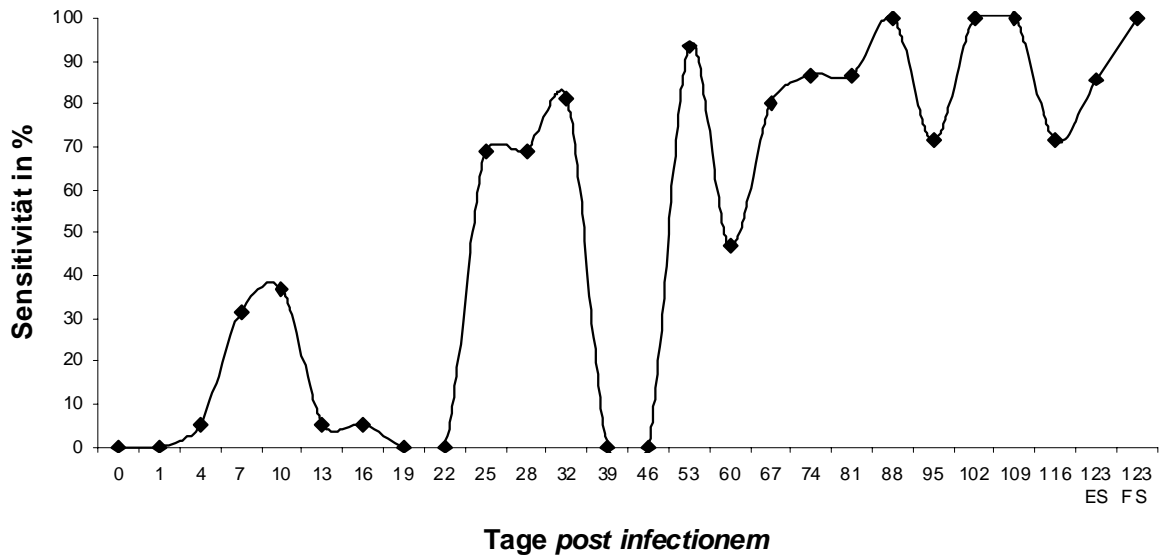


Abbildung 15. Sensitivitäten für den Isotyp IgM mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine.

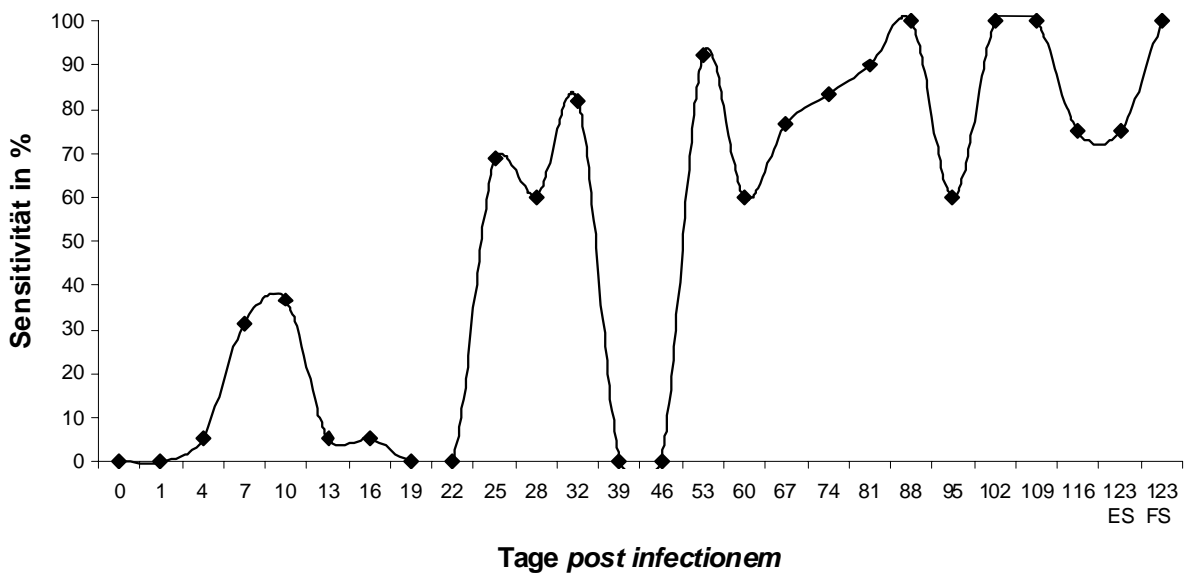


Abbildung 16. Sensitivitäten für den Isotyp IgM mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA für alle experimentell mit *S. Infantis* infizierten Schweine, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faeces nachweisen ließ.

Isotyp IgA

In Abbildung 17 wird die Sensitivität des Salmotype® Pig STM-WCE™ für den Isotyp IgA für alle mit *S. Infantis* infizierten Tiere veranschaulicht. Bis zum 28. Tag *p.i.* zeigte der Test für IgA Antikörper von *S. Infantis* keine Sensitivität.

Auch vom 28. bis zum 74. Tag *p.i.* wurden in einem wellenförmigen Verlauf nur vereinzelt bis zu 7% der Tiere als *Salmonella*-positiv erkannt. Danach setzte sich der undulierende Verlauf der Sensitivität fort und um den 81. und 88. Tag *p.i.* stieg die Sensitivität auf ca. 40%. In der Folge kam es wieder zu einem undulierenden Sensitivitätsverlauf bis zum Tag der Schlachtung, an dem keines der infizierten Tiere IgA-positiv getestet wurde. Dem gegenüber wurden mittels Fleischsaft an diesem Tag 85,7% der Tiere als *Salmonella*-infiziert identifiziert.

Die Abbildung 18 macht deutlich, dass die Sensitivität für alle mit *S. Infantis* infizierten Tiere und den tatsächlich an diesem Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausscheidenden Tiere zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkten einen ähnlichen Verlauf hatten. Am 81. und 88. Tag *p.i.* lag die Sensitivität der in den Faezes *S. Infantis*-positiv getesteten Tiere (40% und 41,7%) höher, als die der infizierten Tiere (33,3% und 26,7%). Auch am 109. Tag *p.i.* war hier die Sensitivität mit 33,3% deutlich höher als die der infizierten Tiere mit 14,3%. Am 116. Tag jedoch wird keines der an diesem Tag *S. Infantis* ausscheidenden Tiere als positiv erkannt, während insgesamt jedoch eine Sensitivität von 14,3% vorlag.

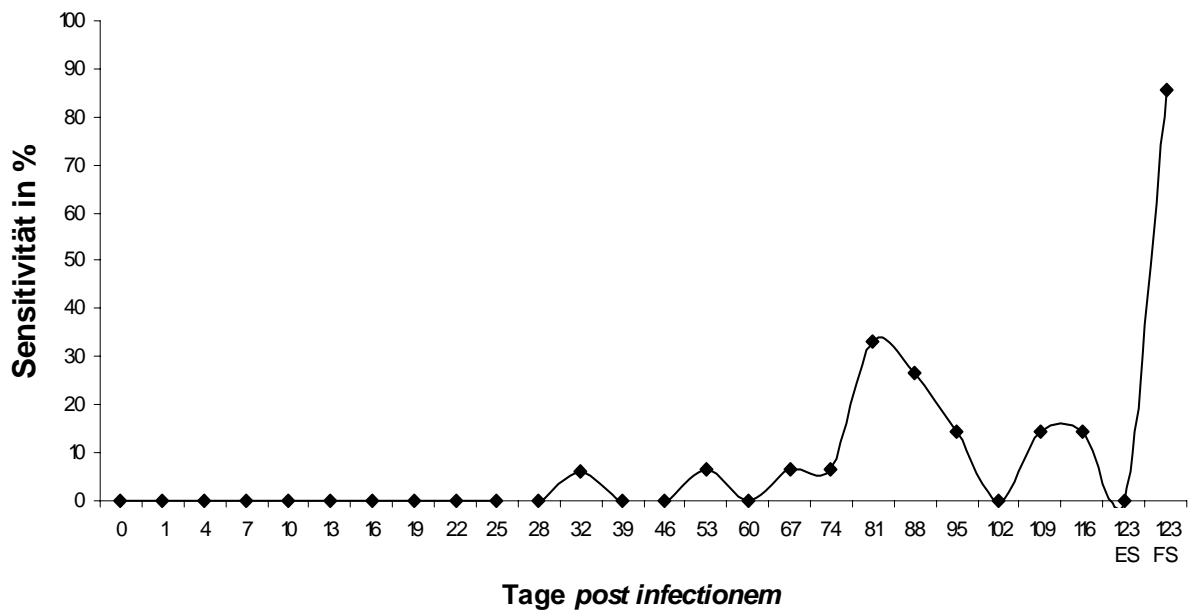


Abbildung 17. Sensitivitäten für den Isotyp IgA mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine.

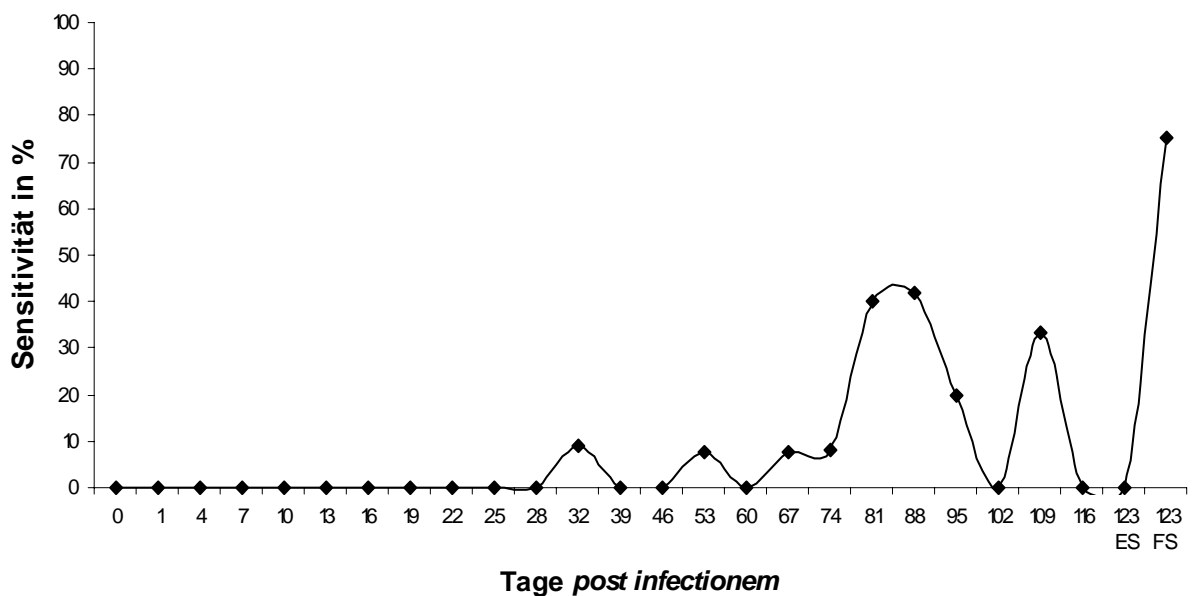


Abbildung 18. Sensitivitäten für den Isotyp IgA mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA bei allen experimentell mit *S. Infantis* infizierten Schweinen, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faezes nachweisen ließ.

Isotyp IgG

Die Abbildung 19 demonstriert die Sensitivitäten des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] für den Isotyp IgG für alle mit *S. Infantis* infizierten Tiere.

Der Verlauf der Sensitivitäten stellt sich auch hier stark wellenförmig dar. Schon am 10. Tag nach der Infektion wurden Werte von 100% erreicht. In der Abbildung 20 erkennt man, dass auch alle Tiere erkannt wurden, welche an diesem Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden. Um den Zeitraum von 13. bis zum 22. Tag *p.i.* hatte der Test dann eine Sensitivität von weniger als 20%. Danach stieg diese um den 25. bis 28. Tag *p.i.* wieder auf Werte zwischen 80 und 87%, um bis zum 39. Tag *p.i.* wieder auf 18% abzufallen. Anschließend erfolgte am 53. Tag *p.i.* ein weiterer Peak mit 80%. Ab dem 74. Tag *p.i.* stabilisierte sich die Testsensitivität auf Werte über 60%, so dass am 123. Tag *p.i.* alle infizierten Tiere (100%) mittels Fleischsaft-Untersuchung erkannt wurden.

Beide Graphen der Sensitivitäten veranschaulichen, dass deutlich weniger Tiere im Endserum als (70%) *Salmonella*-positiv erkannt wurden als im Fleischsaft (100%). Auch hier zeigen die Kurven der Sensitivität infizierter und *S. Infantis* ausscheidender Tiere keine großen Abweichungen. Erst ab dem 74. Tag lag die Sensitivität für die Gesamtheit der infizierten Tiere meist niedriger als die der bakteriologisch positiven Tiere.

4.2.2.4.1.2 Sensitivitäten der einzelnen Isotypen aller mit S. Infantis infizierten Tiere im Vergleich

Die Sensitivitäten (Abbildung 21) von IgM und IgG lassen einen fast analogen undulierenden Verlauf der Testsensitivitäten mit Maxima und Minima zu ähnlichen Zeitpunkten erkennen. Anfangs lag dabei die Sensitivität von IgG höher und ab circa (ca.) der Mitte des Versuchszeitraumes war die Sensitivität von IgM höher. Am letzten Tag des Versuches wurde für beide Isotypen eine Sensitivität von 100% im Fleischsaft erreicht. IgA zeigte eine deutlich niedrigere Sensitivität und reagierte erst ab dem 28. Tag. Der Graph verläuft ebenfalls wellenförmig. Auch bei den in den Faezes *Salmonella Infantis* positiven Tieren (Abbildung 22) zeigen die Graphen einen wellenförmigen Verlauf der Testsensitivitäten, wobei aufgrund der sehr hohen Ausscheidungsrate bei den experimentell mit *S. Infantis* infizierten Tiere prinzipiell der gleiche Verlauf der Testsensitivitäten zu beobachten war.

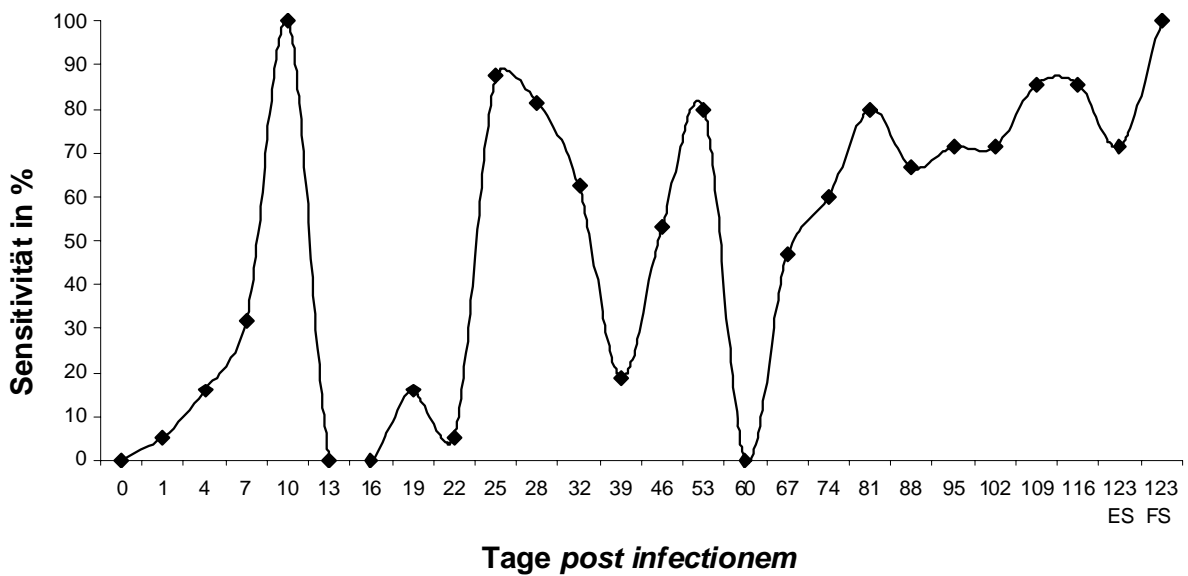


Abbildung 19. Sensitivitäten für den Isotyp IgG mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine.

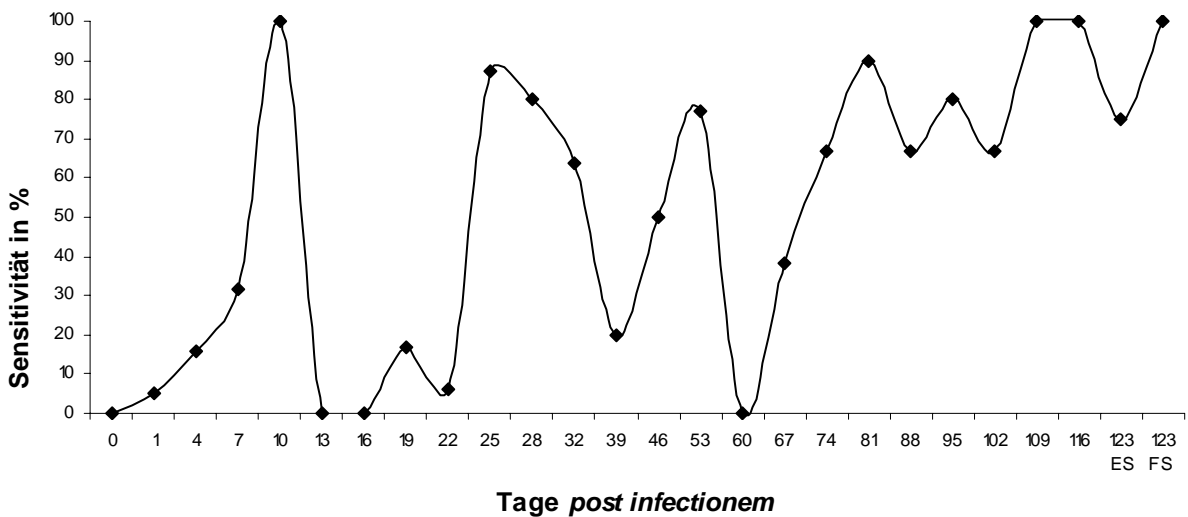


Abbildung 20. Sensitivitäten für den Isotyp IgG mittels Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA bei allen experimentell mit *S. Infantis* infizierten Schweinen, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faezes nachweisen ließ.

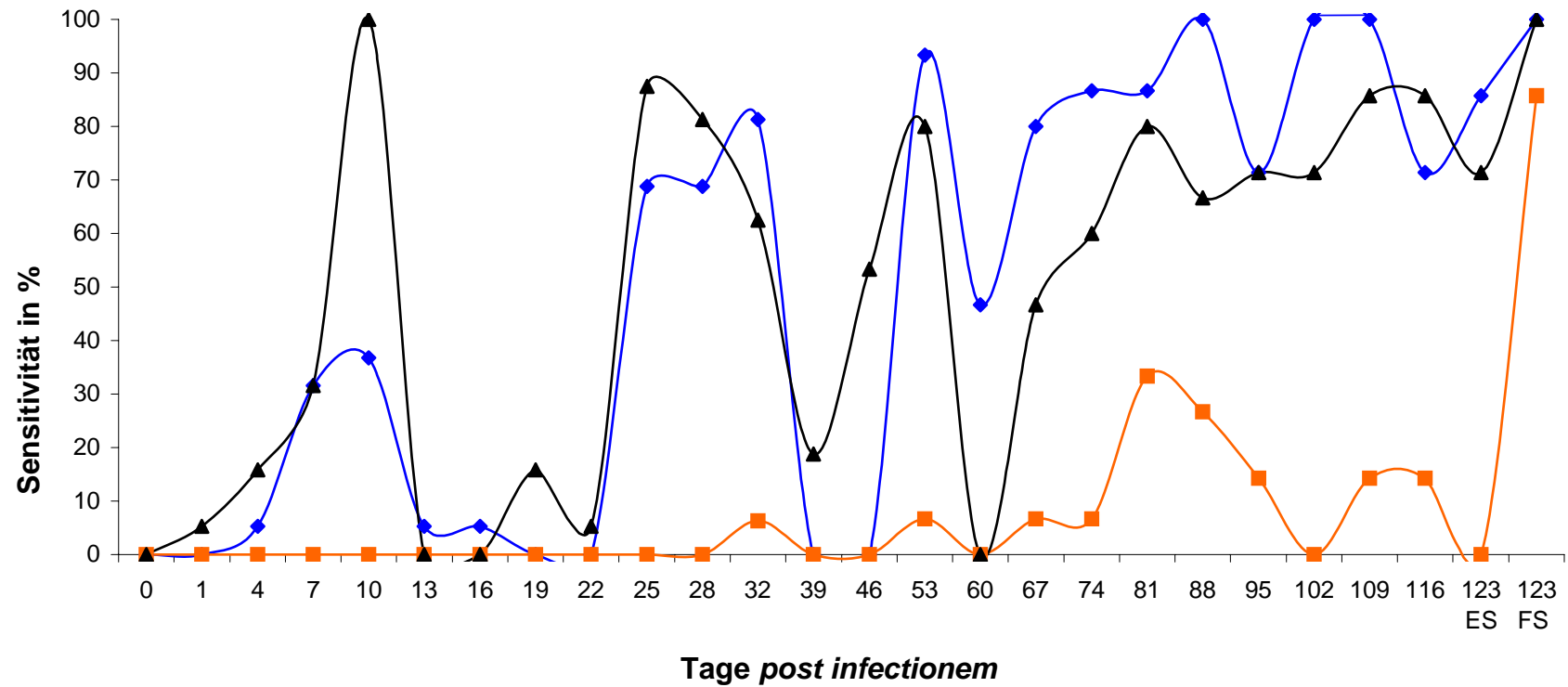


Abbildung 21. Sensitivitäten der einzelnen Isotypen (IgM, IgA, IgG) des Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA für alle experimentell mit *S. infantis* infizierten Schweine im Vergleich. blau (IgM), rot (IgA), schwarz (IgG).

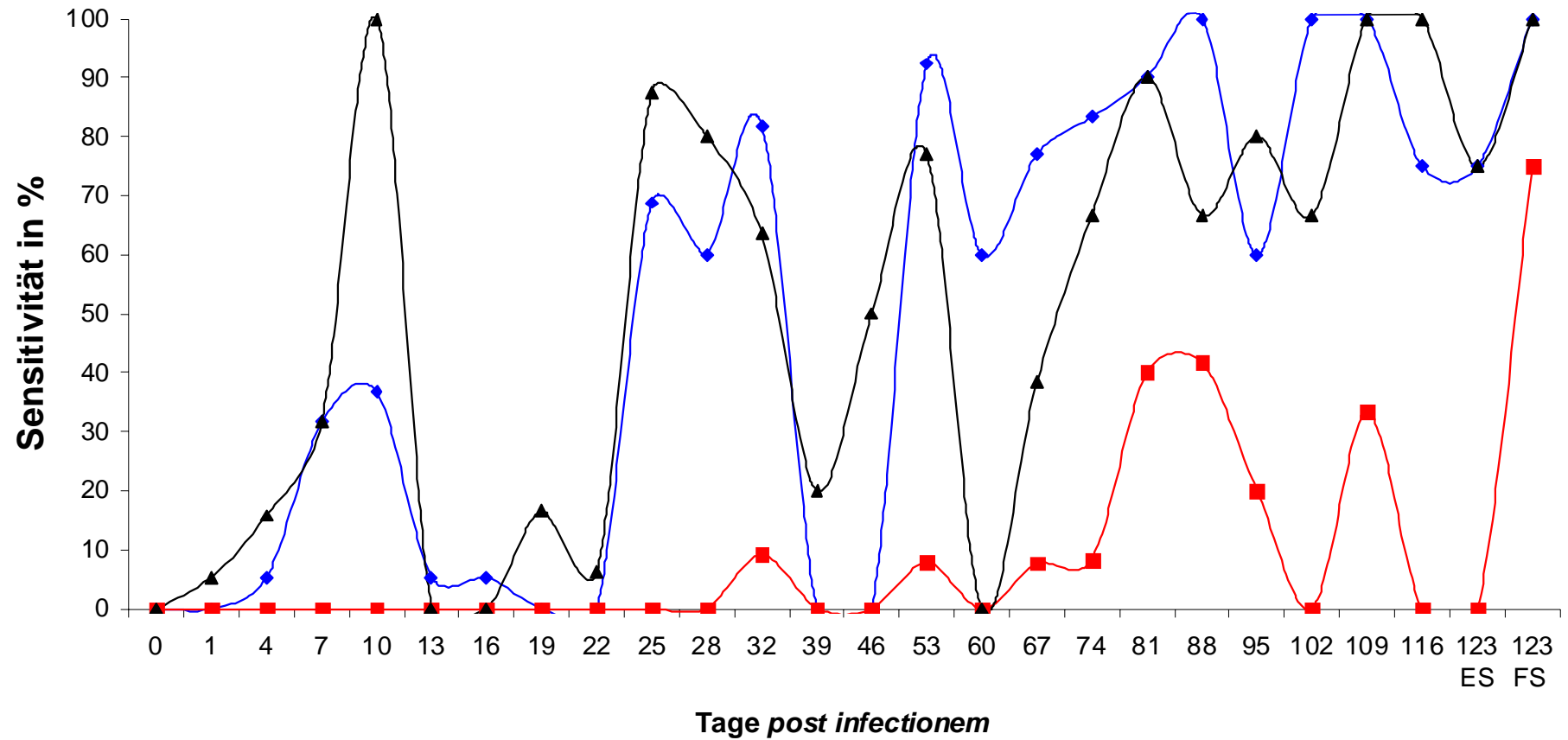


Abbildung 22. Sensitivitäten der einzelnen Isotypen (IgM, IgA, IgG) des Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA für alle experimentell mit *S. Infantis* infizierten Schweine, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faeces nachweisen ließ. blau (IgM), rot (IgA), schwarz (IgG).

4.2.2.4.2 Salmotype[®] PigScreen[™]

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 23 und Abbildung 24) sind jeweils zwei Graphen dargestellt. Ein Graph verdeutlicht die Sensitivitäten des Tests in Bezug auf den Test-Cutoff. Der zweite Graph stellt die Sensitivitäten nach QS-Cutoff dar.

4.2.2.4.2.1 Alle infizierten Tiere

Die Abbildung 23 veranschaulicht somit auch den Vergleich der Sensitivitäten aller mit *S. Infantis* infizierten Tiere nach Test-Cutoff und nach QS-Cutoff. Bis zum 32. Tag *p.i.* zeigte der Test keine serologisch positiven Tiere. Eine Ausnahme bildete der 10. Versuchstag, an welchem mittels Test-Cutoff einige der Tiere als positiv erkannt wurden. Vom 32. bis zum 95. Tag *p.i.* erfolgte ein undulierender Anstieg der Sensitivität, wobei nach QS-Cutoff am 60. und 67. Tag *p.i.* wieder keine infizierten Tiere als *Salmonella*-positiv erkannt wurden. Vom 102. Tag *p.i.* bis zum letzten Tag des Versuchszeitraumes blieb die Sensitivität des Salmotype[®] PigScreen[™] nach QS-Cutoff bei 85,7 %. Sie erreichte während des gesamten Versuches nicht die 100%. Mittels Test-Cutoff wurden hingegen im Endserum und im Fleischsaft Sensitivitäten von 100% erreicht. Die Sensitivitäten nach Test-Cutoff lagen meist deutlich höher als die nach QS-Cutoff.

4.2.2.4.2.2 Ausscheider von *S. Infantis* mit den Faezes

In Abbildung 24 wurden für die Sensitivitäten des Salmotype[®] PigScreen[™] nur die Tiere berücksichtigt, welche zu dem jeweiligen Probenentnahmezeitpunkt *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden. Der Verlauf stellt sich ähnlich wie in Abbildung 23 dar. Die Sensitivität stieg bis zum 81. Tag *p.i.* auf 70 % (QS-Cutoff) bzw. 100% (Test-Cutoff). Nach QS-Cutoff lag die Sensitivität am 95. Tag *p.i.* bei nur 20%, während nach Test-Cutoff 100% der Tiere positiv beurteilt wurden. Ab dem 102.Tag *p.i.* zeigte der Test für beide Cutoff-Werte eine Sensitivität von 100%.

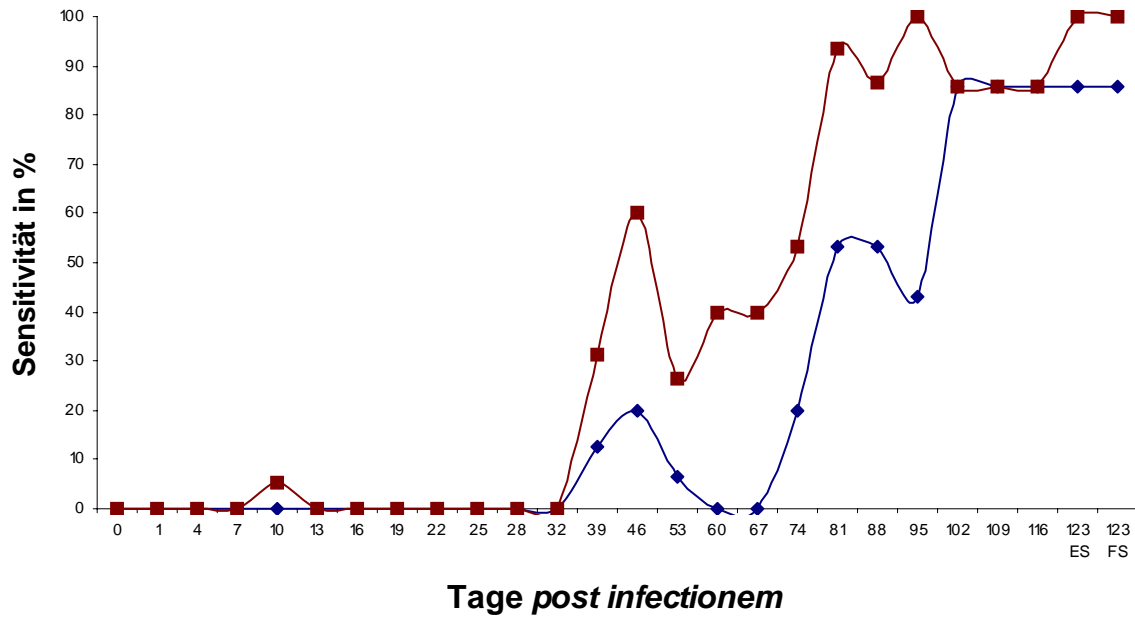


Abbildung 23. Sensitivitäten des Salmotype® PigScreen™ aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine. braun (Test-Cutoff), blau (QS-Cutoff).

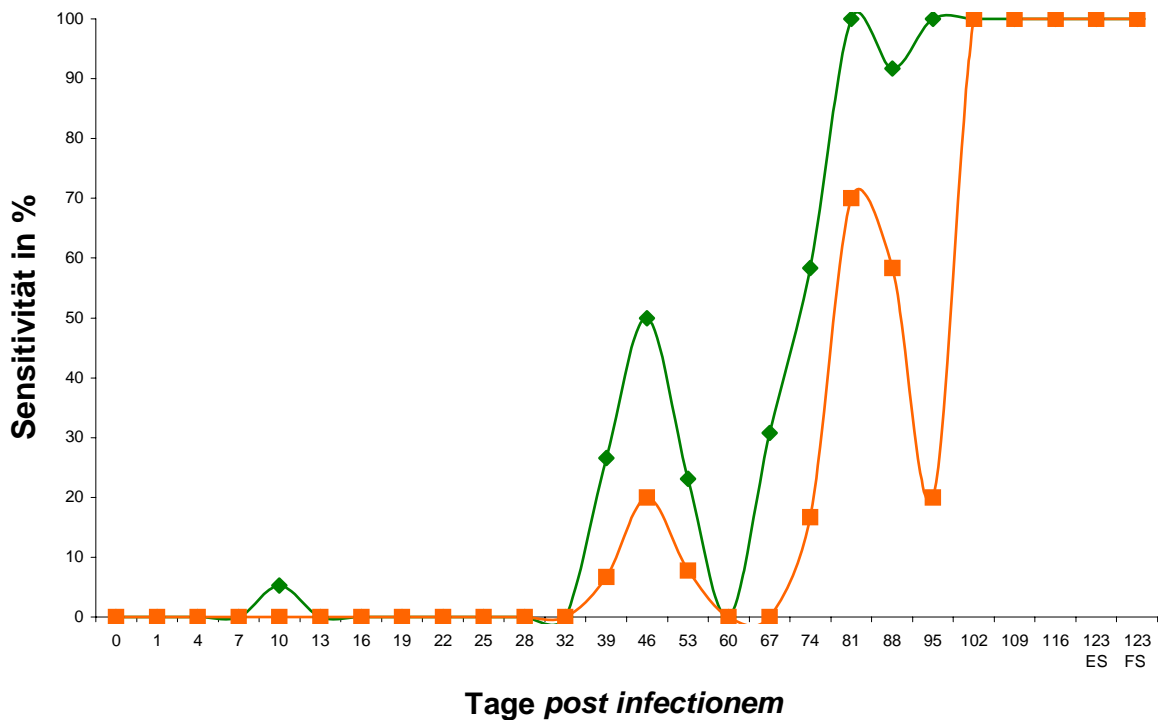


Abbildung 24. Sensitivitäten des Salmotype® PigScreen™ aller experimentell mit *S. Infantis* infizierten Schweine, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faezes nachweisen ließ. grün (Test-CutOff), orange (QS-CutOff).

4.2.2.4.3 HerdChek[®] Swine Salmonella[™]

4.2.2.4.3.1 Alle infizierten Tiere

Die Graphen der Abbildung 25 veranschaulichen die Sensitivitäten für die mit *S. Infantis* infizierten Tiere nach Test-Cutoff und QS-Cutoff. Bis zum 32. Tag *p.i.* wurden mit beiden Cutoff-Werten kaum Tiere als positiv identifiziert. Vom 32. bis zum 67. Tag *p.i.* ist ein kontinuierlicher Anstieg der Sensitivitäten des HerdChek[®] Swine Salmonella[™] nach Test-Cutoff auf 100% zu verzeichnen, welche bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes bestehen blieben. Nach QS-Cutoff wurden erstmals um den 39. Tag *p.i.* Tiere positiv bewertet (5,3%). Dabei stieg die Sensitivität bis zum 74. Tag *p.i.* nach QS-Cutoff auf 66,7% und sank zwischen dem 81. und 95. Tag *p.i.* wieder auf 40 bis 26% ab. Vom 95. Tag bis zur Gewinnung des Endserums zur Schlachtung am 123. Tag war ein Anstieg auf 85,7 % zu erkennen. Dagegen lag die Sensitivität am gleichen Tag im Fleischsaft bei 42,9%.

4.2.2.4.3.2 Ausscheider von *S. Infantis* mit den Faezes

Die Abbildung 26 veranschaulicht die Sensitivitäten für alle mit dem Kot *S. Infantis* ausscheidenden Tiere. Bis zum 60. Tag *p.i.* zeigte der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] nach dem QS-Cutoff keine serologisch positiven Befunde. Eine Ausnahme bildete der 39. Versuchstag mit 6,6%. Ab dem 60. Tag *p.i.* stieg die Sensitivität auf bis zu 66,7% (74.Tag), um dann vom 81. bis 95. Tag *p.i.* wieder auf 20% abzufallen. Bis zum 123. Tag konnte im Endserum dann wieder ein Anstieg auf 100% verzeichnet werden. Im Fleischsaft wurden jedoch auch hier nur 50% der Tiere erkannt. Die mittels Test-Cutoff errechneten Sensitivitäten lagen deutlich höher. Schon um den 4. und 7. Tag *p.i.* wurden 5,3 % der Tiere als positiv beurteilt. Danach folgte eine dreiwöchige Phase, in welcher der Test nicht reagierte. Am 25. Tag *p.i.* stieg die Sensitivität wieder an und erreichte am 46. Tag *p.i.* 50%. Ab dem 67. Tag *p.i.* wurden alle Schweine, welche an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden detektiert.

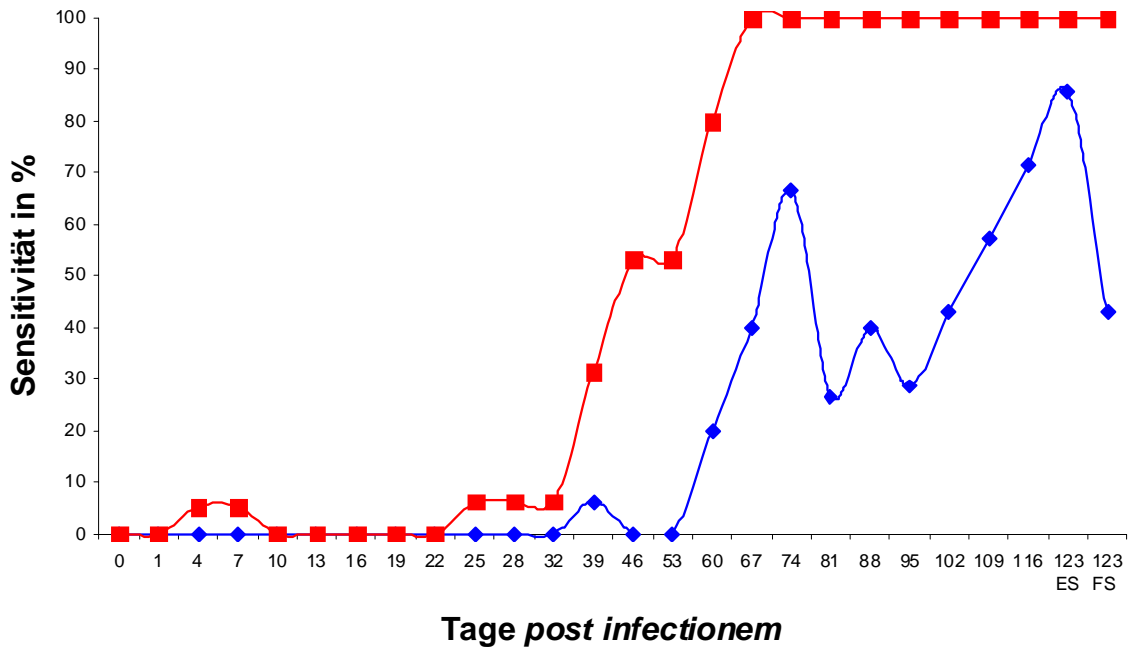


Abbildung 25. Sensitivitäten des HerdChek[®] Swine Salmonella[™] aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine. rot (Test-Cutoff), blau (QS-Cutoff).

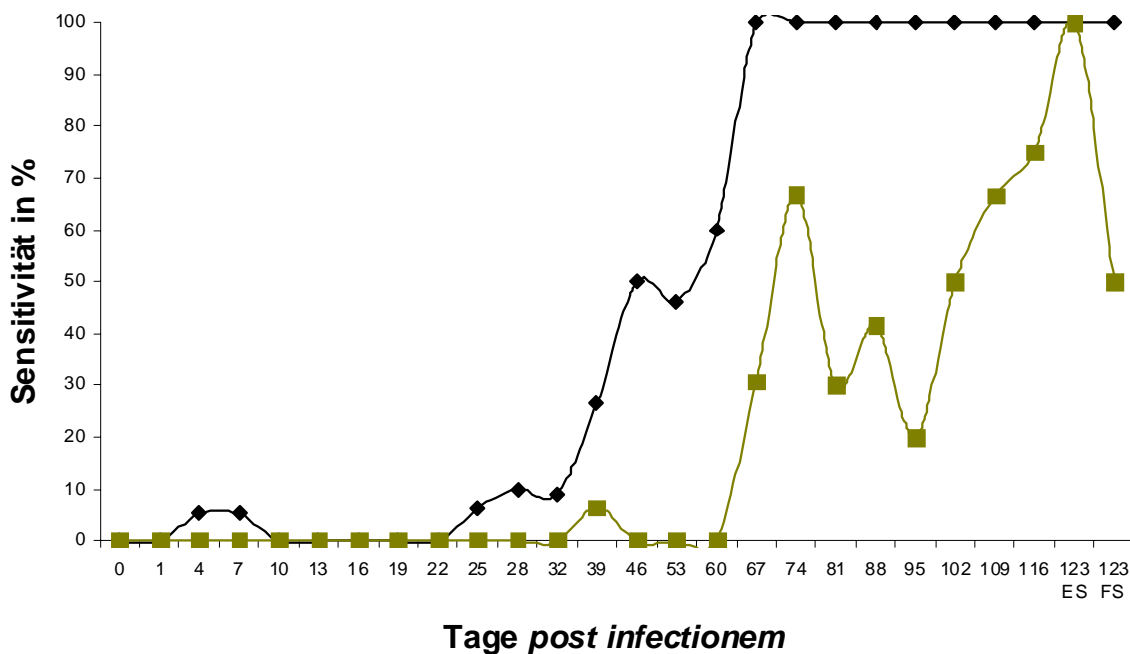


Abbildung 26. Sensitivitäten des HerdChek[®] Swine Salmonella[™] aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faezes nachweisen ließ. blau (Test-Cutoff), grün (QS-Cutoff).

4.2.2.4.4 Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™]

Da der Test-Cutoff des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] dem QS-Cutoff entspricht, ist in den folgenden Abbildungen jeweils nur ein Graph dargestellt.

4.2.2.4.4.1 Alle infizierten Tiere

Die Abbildung 27 stellt die Sensitivitäten mit dem Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] für die mit *S. Infantis* infizierten Tiere über die gesamte Mastperiode dar. Am 7. Tag nach erfolgter Infektion wurden erstmals positive Tiere erkannt (5,3%). Vom 10. bis zum 32. Tag *p.i.* zeigte der Test jedoch keine positiven Befunde.

Vom 32. Tag bis zum 102. Tag (85,7%) stieg die Sensitivität in Wellen kontinuierlich an. Nach einem leichten Abfall der Sensitivität um den 109. Tag, blieb sie ab dem 116. Tag bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes bei 85,7%.

4.2.2.4.4.2 Ausscheider von *S. Infantis* mit den Faezes

Die Sensitivität des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] in Bezug auf alle Tiere, welche an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mit den Faezes ausschieden, dargestellt in Abbildung 28, lag bis zum 32. Tag *p.i.* meist bei Null. Dagegen stieg sie vom 32. bis zum 53. Tag *p.i.* auf 53,9%. Während zum 60. Tag *p.i.* ein Abfall auf 20% zu verzeichnen war, folgte bis zum 81. Tag *p.i.* ein weiterer Anstieg auf 90%. Nachdem die Sensitivität am 95. Tag *p.i.* auf 40% abgefallen war, lag sie ab dem 102. Tag bis zum Ende des Infektionsversuches bei 100%.

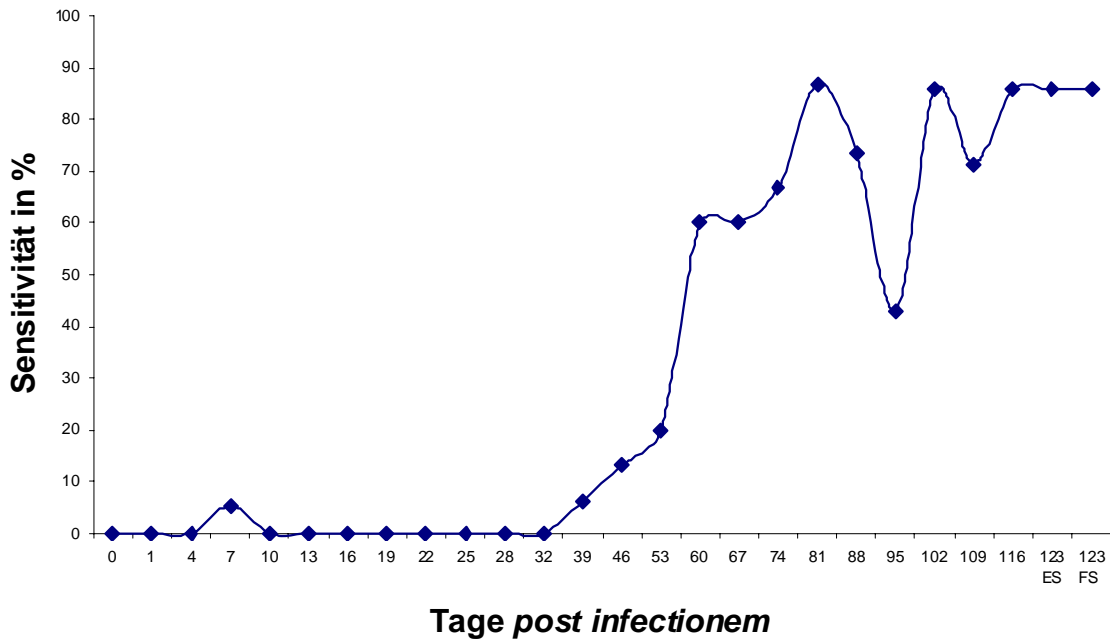


Abbildung 27. Sensitivitäten des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine.

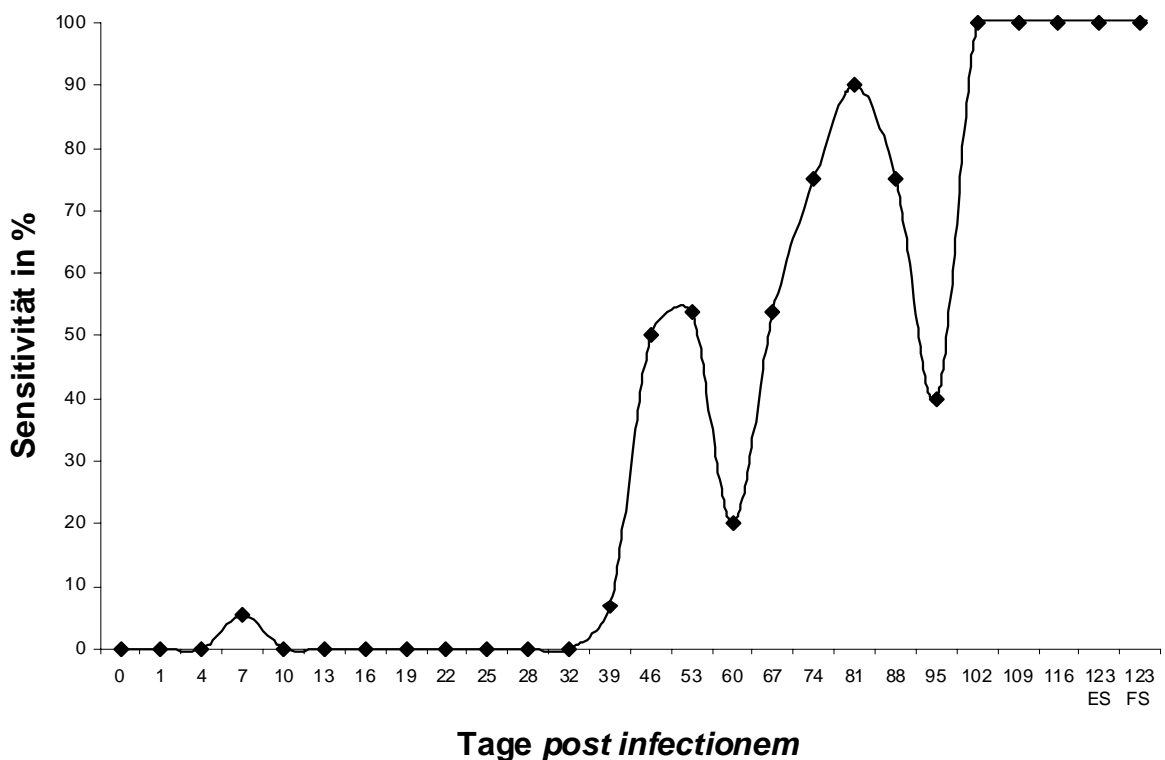


Abbildung 28. Sensitivitäten des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] aller experimentell mit *S. Infantis* infizierter Schweine, bei welchen sich an dem jeweiligen Tag *S. Infantis* mittels bakteriologischer Untersuchung in den Faezes nachweisen ließ.

4.2.2.5 Sensitivitäten der vier getesteten ELISA-Systeme im Vergleich

Tabelle 4. Sensitivitäten aller getesteten ELISA-Systeme mittels Test-Cutoff und QS-Cutoff im Vergleich bei der experimentellen *S. Infantis* Infektion beim Schwein

	Test-Cutoff				QS-Cutoff			
	0-32 d <i>p.i.</i>	39-96 d <i>p.i.</i>	102-123 d <i>p.i.</i>	Mittlere Test- Sensitivität	0-32 d <i>p.i.</i>	39-96 d <i>p.i.</i>	102-123 d <i>p.i.</i>	Mittlere Test- Sensitivität
Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA	41,88%	75,41%	94,28%	70,52%	41,88%	75,41%	94,28%	70,52%
Salmotype® PigScreen™	0,44%	59,02%	91,42%	50,29%	0%	23,19%	85,70%	36,30%
Enterisol® Salmonellen- Diagnostikum™	0,44%	47,69%	82,84%	43,66%	0,44%	47,69%	82,84%	43,66%
HerdChek® Swine Salmonella™	2,46%	79,77%	100,00%	60,74%	0%	25,37%	60,01%	28,46%

Tabelle 5. Sensitivitäten aller getesteten ELISA-Systeme in Endserum und Fleischsaft mittels Test-Cutoff und QS-Cutoff im Vergleich bei der experimentellen *S. Infantis* Infektion beim Schwein.

	Test-Cutoff				QS-Cutoff			
	HerdChek® Swine Salmonella™	Enterisol® Salmonellen Diagnos- tikum™	Salmotype® PigScreen™	Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA	HerdChek® Swine Salmonella™	Enterisol® Salmonellen Diagnos- tikum™	Salmotype® PigScreen™	Salmotype® Pig STM-WCE™ ELISA
ES	100%	85,7%	100%	85,7%	85,7%	85,7%	85,7%	85,7%
FS	100%	85,7%	100%	100%	42,9%	85,7%	85,7%	100%

4.2.2.5.1 Sensitivitäten nach Test-Cutoff

Die Abbildung 29 stellt die Sensitivitäten der vier getesteten ELISA-Systeme im Vergleich dar. Der Graph für die Sensitivitäten des Salmotype® Pig STM-WCE™ ergibt sich hier aus den insgesamt, durch die Isotypen IgM, IgA und IgG, positiv bewerteten Tiere an dem jeweiligen Versuchstag. Bis zum 32. Tag *p.i.* lag die Sensitivität bei den drei getesteten LPS-

ELISA-Tests unter 10%. Erstmals wurden positive Tiere durch den HerdChek® Swine Salmonella™ am 4. Tag *p.i.* erkannt. Am 7. Tag *p.i.* folgte das Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™. Der Salmotype® PigScreen™ zeigte erst am 10. Tag *p.i.* eine Sensitivität von 5,3%. Am diesen Tag lag jedoch die Sensitivität der anderen beiden Tests wieder bei Null. Der Salmotype® Pig STM-WCE™ dagegen erreichte schon am 10. Tag *p.i.* eine Sensitivität von 100%. Erstmals wurden mit 5,3% am 1. Tag *p.i.* positive Tiere erkannt. Während sich durch die drei getesteten LPS-ELISA-Systeme zunehmend eine höhere Sensitivität verzeichnen ließ, zeigte der Salmotype® Pig STM-WCE™ bis zum 32. Tag *p.i.* einen undulierenden Verlauf. Hierbei lag am 10. Tag *p.i.* und auch am 25. Tag *p.i.* eine Sensitivität von 100% vor. Auch Tabelle 4 lässt erkennen, dass der Salmotype® Pig STM-WCE™ im ersten Abschnitt der experimentellen Infektion mit *S. Infantis* (0. – 32. Tag) eine deutlich höhere Sensitivität (41,88%) aufwies als die drei anderen ELISA-Systeme, wobei das Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ und der Salmotype® PigScreen™ mit 0,4% die geringsten Sensitivitäten zeigten. Die Sensitivitäten des HerdChek® Swine Salmonella™ lagen bei der Anwendung des Test-Cutoff ab dem 39. Tag *p.i.* meist höher als die Sensitivitäten der anderen drei getesteten ELISAs. Ab dem 67. Tag *p.i.* wurden durch den HerdChek® Swine Salmonella™ mittels Test-Cutoff alle Tiere als *Salmonella*-positiv erkannt. Während die Sensitivität des HerdChek® Swine Salmonella™ kontinuierlich anstieg, zeigten Salmotype® PigScreen™ und Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ ein eher undulierendes Ansteigen der Sensitivitäten. Auch der Salmotype® Pig STM-WCE™ ließ in dieser Infektionsphase weiterhin einen undulierenden Verlauf erkennen. Die Tabelle 4 verdeutlicht, dass in der zweiten Infektionsphase vom 39. bis zum 95. Tag *p.i.*, der HerdChek® Swine Salmonella™ im Durchschnitt die höchste Sensitivität mit 79,77% aufwies dicht gefolgt von dem Salmotype® Pig STM-WCE™ mit 75,41%. Die niedrigste durchschnittliche Sensitivität vom 39. bis 95. Tag *p.i.* lag bei dem Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ mit 47,69% vor. Im Endserum und Fleischsaft erkannte der Salmotype® PigScreen™ alle Tiere als positiv, während das Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ nur eine Sensitivität von 85,7% zeigte. In Tabelle 5 wird veranschaulicht, dass die drei getesteten LPS-ELISA sich dadurch auszeichneten, dass sie im Endserum und Fleischsaft mittels Test-Cutoff eine übereinstimmende Sensitivität aufwiesen. Dagegen zeigte der Salmotype® Pig STM-WCE™ im Fleischsaft eine Sensitivität von 100% und im Blutserum von nur 85,7%. Die Tabelle 4 hebt auch in der dritten Infektionsphase (102. – 123. Tag) die durchschnittlichen Sensitivitäten hervor. Auch in diesem Zeitraum wies der HerdChek® Swine Salmonella™ mit 100% die höchste Sensitivität auf, gefolgt von dem Salmotype® Pig STM-WCE™ (94,28%)

und dem Salmotype[®] PigScreen[™] (91,42%). Das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] zeigte die geringste Sensitivität (82,84%).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] mittels Test-Cutoff in allen Infektionsphasen die niedrigste durchschnittliche Sensitivität aufwies und somit auch die geringste Gesamtsensitivität von nur 43,66% bot. Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] dagegen hatte die höchste Gesamtsensitivität von 70,52%. Dieser Test zeichnete sich vor allem durch sein frühzeitiges Erkennen positiver Tiere und einen undulierenden Verlauf aus. Jedoch zeigt er auch einen unterschiedlichen Befund in Endserum und Fleischsaft. Der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] ließ in der Spätphase der Infektion die höchste Sensitivität mit 100% erkennen, während er in der Frühphase durchschnittlich nur 2,5% aufwies. Die Gesamtsensitivität lag bei 60,74%. Der Salmotype[®] PigScreen[™] ließ in der ersten Infektionsphase ähnliche Sensitivitäten wie die zwei anderen LPS-ELISA-Systeme erkennen. Jedoch lag dessen Sensitivität in der letzten Phase deutlich höher als die des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™]. Die Gesamtsensitivität betrug 50,29%

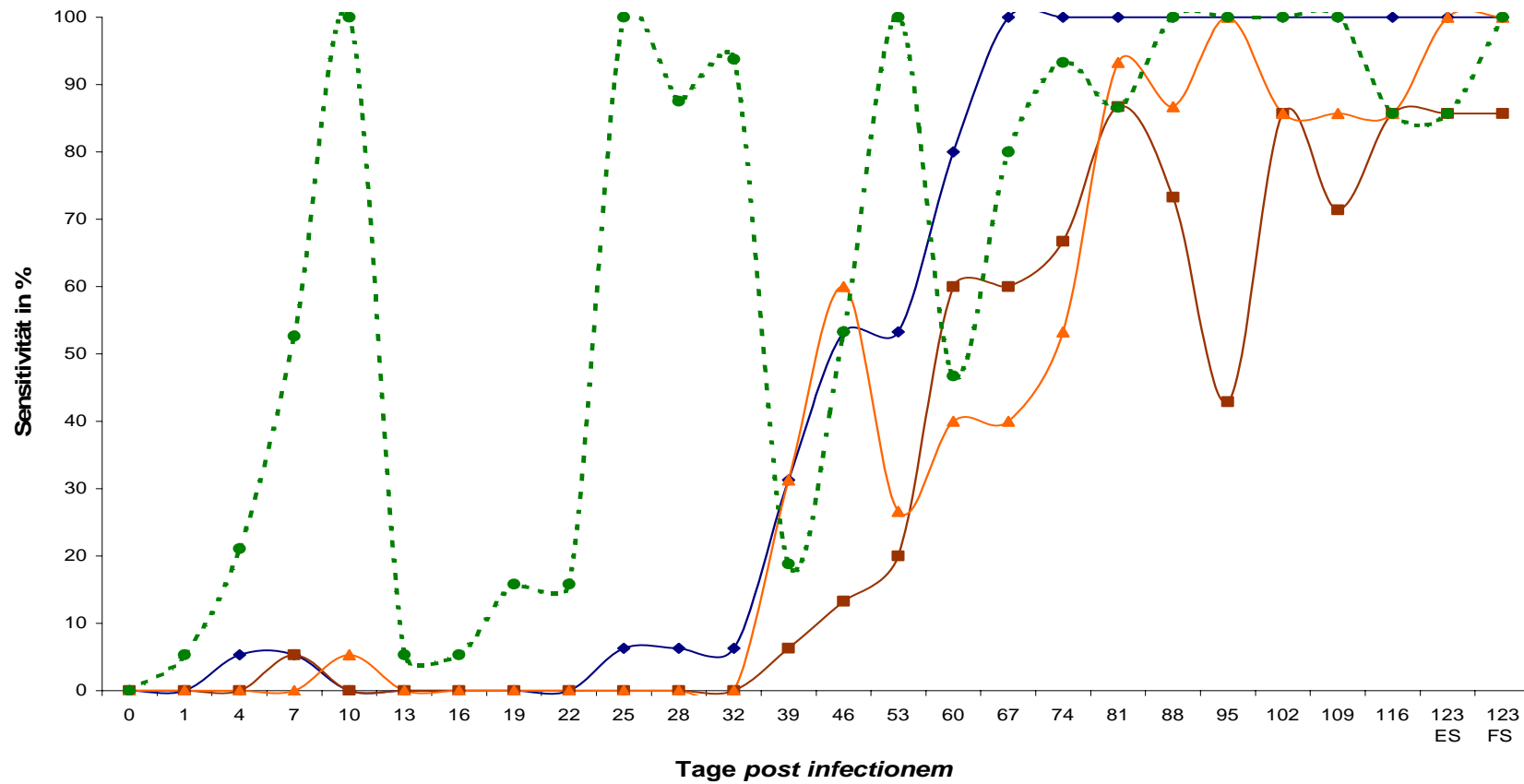


Abbildung 29. Sensitivitäten nach Test-Cutoff aller ELISA-Testsysteme im Vergleich, für alle experimentell mit *S. infantis* infizierten Schweine. Grün gestrichelt (Salmotype® Pig STM-WCE™), braun (Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™), blau (HerdChek® Swine Salmonella™), orange (Salmotype® PigScreen™).

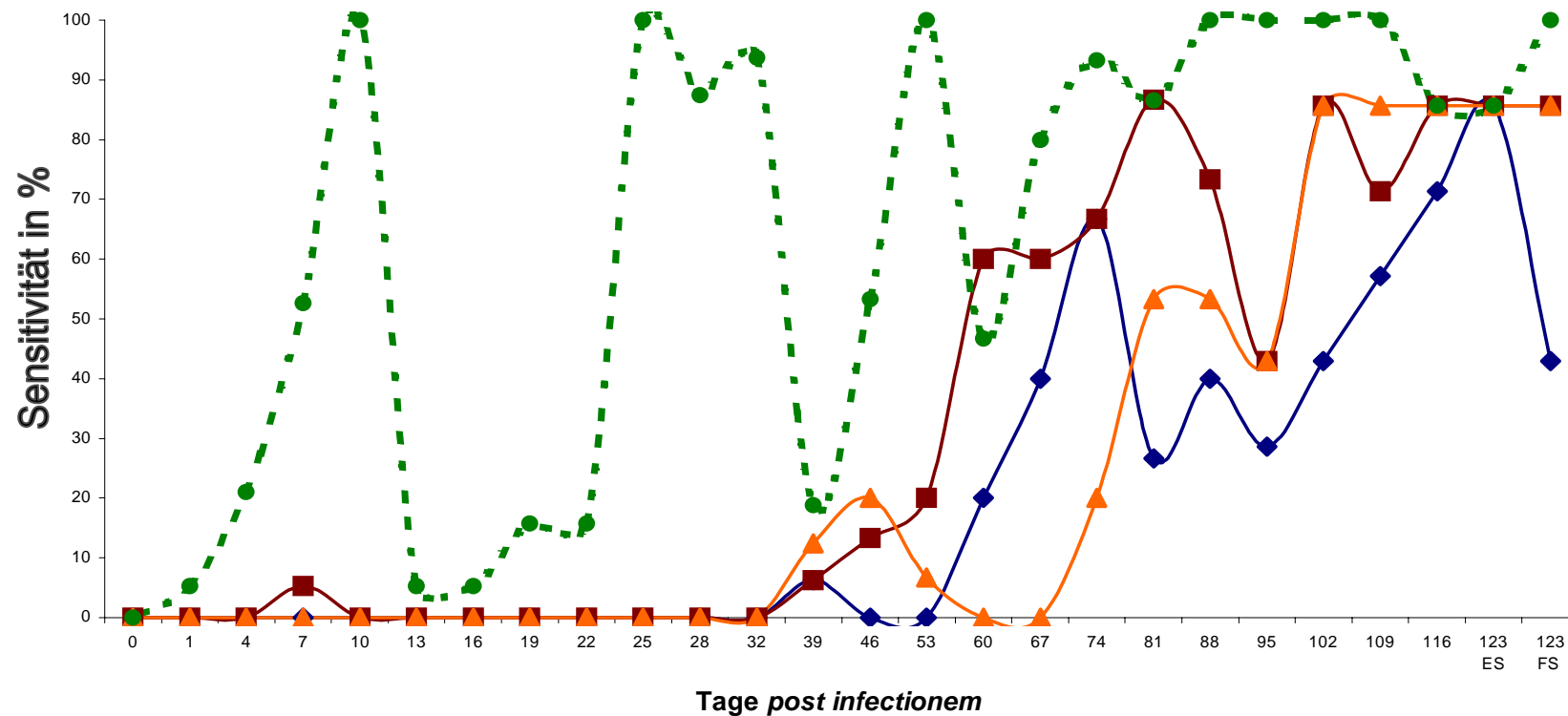


Abbildung 30. Sensitivitäten nach QS-Cutoff aller ELISA-Testsysteme im Vergleich für alle experimentell mit *S. infantis* infizierten Tiere. grün gestrichelt (Salmotype® Pig STM-WCE™), braun (Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™), blau (HerdChek® Swine Salmonella™), orange (Salmotype® PigScreen™).

4.2.2.5.2 Sensitivitäten nach QS-Cutoff

In Abbildung 30 sind die Sensitivitäten aller vier getesteten ELISA-Systeme nach QS-Cutoff im Vergleich dargestellt. Die Sensitivitäten des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] und des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] ergeben durch das Übereinstimmen des QS-Cutoff mit dem Test-Cutoff einen gleichen Verlauf. Während durch die drei LPS-ELISA-Tests in den ersten 32 Tagen *p.i.* kaum Tiere als positiv erkannt wurden, zeigte der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] schon am ersten Tag nach der Infektion eine Sensitivität von 5,3%. Bis zum 32. Tag *p.i.* erfolgte ein undulierender Verlauf mit Werten von 5,3% bis 100%. Auch nach QS-Cutoff wies der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] in der ersten Infektionsphase die höchste Sensitivität auf, während der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] und der Salmotype[®] PigScreen[™] keine Tiere als *Salmonella*-positiv erkannten. Am 39. Tag *p.i.* war die Sensitivität aller Tests ähnlich (6,3 – 18,8%), wobei die des Salmotype Pig STM-WCE[™] am höchsten lag. Große Diskrepanzen ergaben sich jedoch wieder um den 46. und 53. Tag *p.i.*. Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] stieg in dieser Zeit auf 53-100% an. Dagegen zeigte der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] keine positiven serologischen Befunde. Der Salmotype[®] PigScreen[™] bewertete am 53. Tag *p.i.* nur 5,3% der Tiere als positiv. Ebenso groß sind die Differenzen an den folgenden zwei Untersuchungszeitpunkten. Der Salmotype[®] PigScreen[™] erkannte am 60. und 67. Tag *p.i.* keine *S. Infantis* positiven Tiere, währenddessen sich der HerdCheck[®] Swine Salmonella[™] in der Sensitivität von 20 auf 40% steigerte. Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] verzeichnete am 60. Tag *p.i.* mit 47,6% sogar eine niedrigere Sensitivität als das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™], welcher 60% erreichte. Um den 74. Tag *p.i.* wurde die geringste Anzahl positiver Tiere durch den Salmotype[®] PigScreen[™] erkannt (20%). Das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] und der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] verzeichneten 66,7% der Tiere als positiv. Dagegen ließen sich durch den Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] 93,3% der infizierten Tiere nachweisen. Auch um den 81. und 88. Tag *p.i.* waren große Unterschiede in der Sensitivität der einzelnen Tests zu verzeichnen. Ab dem 81. Tag *p.i.* reagierte der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] bis zum 95. Tag *p.i.* mit 100% Sensitivität. Die drei in Deutschland zugelassenen LPS-ELISA ließen von diesem Zeitpunkt an einen Abfall erkennen. Dabei lag der Tiefpunkt um den 95. Tag *p.i.*. Die Tabelle 4 macht ersichtlich, dass auch in der zweiten Infektionsphase der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] die höchste durchschnittliche Sensitivität zeigte. Die niedrigsten Sensitivitäten wurden durch HerdChek[®] Swine Salmonella[™] (25,37%) und Salmotype[®] PigScreen[™] (23,19%) erreicht, während das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] bei 47,69 % lag. Ab

dem 102. Tag *p.i.* reagierte der Salmotype[®] PigScreen[™] mit einer Sensitivität von 85,7%. Der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] stieg ab dem 95. Tag *p.i.* kontinuierlich an und erreichte am letzten Untersuchungszeitpunkt im Endserum 85,7%, im Fleischsaft jedoch nur 42,9%. Das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] zeigte ab dem 116. Tag eine Sensitivität von 85,7%. Der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] lag am 116. Tag und am 123. Tag im Endserum ebenfalls bei 85,7 %, im Fleischsaft jedoch bei 100%. In der letzten Infektionsphase schnitt der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] am schlechtesten ab, während die anderen getesteten ELISA-Systeme ähnliche Sensitivitäten aufwiesen (Tabelle 4). Das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] und der Salmotype[®] PigScreen[™] erkannten im Fleischsaft und im Endserum die gleiche Anzahl positiver Tiere, während die zwei anderen Testsysteme Unterschiede aufwiesen, wobei der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] im Fleischsaft 50% weniger positive Tiere erkannte. Die Tabelle 4 verdeutlicht nochmals, dass durch den HerdChek[®] Swine Salmonella[™] mittels QS-Cutoff die niedrigste Gesamtsensitivität vorlag, während sie beim Salmotype[®] Pig STM-WCE am höchsten lag. Mittels QS-Cutoff zeigte der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] für alle Infektionsphasen, vor allem in Phase eins, die höchste Sensitivität.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Evaluierung der vier in Deutschland zugelassenen ELISA-Testsysteme zur serologischen Diagnostik von *S. Infantis* beim Schwein. Dabei wurde auch die Auswirkung von unterschiedlichen Cutoff-Werten auf die jeweilige Testsensitivität untersucht. Bisher erfolgte eine derartige vergleichende Evaluierung von ELISA-Systemen nur serovarspezifisch im Rahmen von Ringversuchen an nicht gut charakterisierten Seren. Das Probenmaterial dieser Untersuchung stammte von einer Gruppe salmonellenfreier Schweine, welche intragastral mit *S. Infantis* infiziert wurden. Die Kontrolle des Infektionsverlaufes erfolgte über eine wöchentliche bakteriologische Untersuchung der Kotproben und die parallele serologische Untersuchung. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die serovarspezifische ELISA-Sensitivität können dazu beitragen, Schwächen und Stärken der Serodiagnostik von Salmonelleninfektionen beim Schwein aufzuzeigen und können somit zu einem verbesserten Verbraucherschutz beitragen. Gleichzeitig werden Aussagen über das Ausscheidungsverhalten von mit *S. Infantis* infizierten Schweinen getroffen.

5.1 Klinik nach *S. Infantis* Infektion beim Schwein

S. Infantis gehört zu der Gruppe, der sporadisch vorkommenden, nicht speziesadaptierten *Salmonella*-Serovare und spielt somit klinisch bei Schweinen eine untergeordnete Rolle. Jedoch kann es beim Menschen durch den Genuss von kontaminiertem Schweinefleisch zu Erkrankungen kommen, weshalb *S. Infantis* wichtig in der Epidemiologie von Lebensmittelinfektionen ist (SELBITZ 2006). Andererseits können bei Einzeltieren auch als harmlos angesehene Serovare stärkere klinische Symptome hervorrufen (BELOEIL et al. 1999). Betrachtet man den klinischen Verlauf, nach der in dieser Arbeit untersuchten experimentellen Infektion mit *S. Infantis*, fällt auf, dass es in diesem Fall bei allen Tieren zwei bis drei Tage *p.i.* zu einer mittel- bis hochgradigen Diarrhoe kam. Anschließend entwickelte sich dann eine intermittierende geringgradige Symptomatik. Einzeltiere wiesen in den ersten Tagen *p.i.* Erbrechen oder Husten auf. Demzufolge prägte sich die Klinik deutlich stärker aus als vermutet. Die Untersuchungen von BELOEIL (1999) werden insofern bestätigt, da auch hier nur Einzeltiere von stärkeren klinischen Symptomen betroffen waren.

Es ist davon auszugehen, dass die Ursache der relativ starken klinischen Symptomatik darin liegt, dass die Tiere vor der experimentellen Infektion noch keinen Kontakt mit anderen *Salmonella* spp. hatten. Unter nicht experimentell bedingten Umständen erweisen sich andere Serovare z.B. *S. Typhimurium* als stärker virulent. Sie sind häufiger in den Beständen verbreitet und führen häufig schon im frühen Leben der Tiere zu Infektionen. Die darauf folgende Immunantwort schützt die Tiere gegen erneute Infektionen mit schwach virulenteren *Salmonella*-Serovaren, so dass sich hierbei die Klinik weniger stark ausprägt (GAREIS 1995; JOHNSTON et al. 2001).

Eine weitere Begründung kann in der intragastralen Verabreichung einer relativ hohen Dosis (1×10^{10} KBE) von Salmonellen liegen. Es sollte hiermit sichergestellt werden, dass alle Tiere mit *S. Infantis* infiziert werden und somit eine Immunreaktion aufweisen, die letztlich Grundlage für die vergleichenden serologischen Untersuchungen war. Dies korreliert mit den Aussagen von DEDIE (1993), der feststellte, dass durch kleinere Dosen ($10^3 - 10^5$ KBE) bei Schweinen häufig eine vorübergehende Haftung im Darm erfolgt, welche zu einer Ausscheidung mit den Faezes führt. Dagegen kommt es bei höheren Dosen ($10^7 - 10^9$ KBE) zu längerer, oft überaus hartnäckiger Dauerausscheidung, die vereinzelt mit Erkrankungssymptomen verbunden ist (DEDIÈ et al. 1993).

5.2 Kulturelle Diagnostik von *S. Infantis*

5.2.1 Ausscheidung von *S. Infantis* mit den Faezes

Durch die bakteriologische Untersuchung der Kotproben von mit *S. Infantis* infizierten Schweinen, sollte zum einem untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Immunreaktion auf die Infektion und dem Ausscheidertum besteht. Zum anderen sollte durch die bakteriologische Untersuchung eine mögliche Zweitinfektion mit einer anderen *Salmonella*-Serovar ausgeschlossen werden, da dadurch die Ergebnisse der serologischen Diagnostik verfälscht worden wären. BAUM et al. (1999) untersuchten die Ausscheidung von Salmonellen nach experimenteller Infektion von Schweinen mit *S. Typhimurium*, *S. Infantis* und *S. Cholerasuis* und stellten dabei fest, dass bis zu vier Tage *p.i.* Salmonellen mit dem Kot ausgeschieden wurden, in Einzelfällen sogar bis 23 Tage *p.i.* Danach erfolgte eine geringgradig intermittierende Ausscheidung. Jedoch war die Infektionsdosis bei weitem niedriger. Nachdem HURD (2001) Schweine einer kontaminierten

Umgebung ausgesetzt hatte, wurde offenbar, dass schon nach 30 Minuten eine Infektion stattgefunden hatte. Nach einer experimentellen Infektion mit *S. Typhimurium* waren über 10 Tage Salmonellen im Kot nachweisbar, nach 4-5 Monaten jedoch nur noch gelegentlich. Die hier vorliegenden Ergebnisse decken sich nicht vollständig mit denen der Literatur. So wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass bis zu 16 Tagen *p.i.* von allen Tieren Salmonellen ausgeschieden wurden, wobei sich anschließend eine undulierende Ausscheidungsrate darstellen ließ. Jedoch erfolgte zu keinem Zeitpunkt des Versuches ein Sistieren der Ausscheidung im Bestand bzw. der Versuchsgruppe. Führt man sich vor Augen, dass es immer wieder einzelne Tiere betraf, welche *S. Infantis* mit dem Kot ausschieden, so kann man sich vorstellen, dass der Kot wiederholt als Reinfektionsquelle für die anderen Tiere fungierte, welche nach erneuter Infektion wiederum Salmonellen ausschieden. Dadurch ließ sich über den gesamten Versuchszeitraum von 123 Tagen eine *S. Infantis* Ausscheidung nachweisen. Daneben stellen verschiedene Faktoren, wie ein schlechtes Stallklima und Blutentnahmen, Stresssituationen für die Tiere dar, welche z.B. durch BLECHA et al. (1985) mittels erhöhter Cortisol-Werte im Serum nachgewiesen wurden. In dessen Folge kommt es neben einer verstärkten epithelialen Invasion auch zu einer Schwächung der immunologischen Abwehrmechanismen (SCHWARTZ 1999; SEIDLER et al. 2001), was zu einer verstärkten Ausscheidung der Salmonellen über den Darm führen kann (DAVIES et al. 2000). Ebenso zeigten FUNK et al. (2001a), dass eine hohe Belegdichte zu einem vermehrten Auftreten von Salmonelleninfektionen führt.

5.2.2 Qualitativer Nachweis von *S. Infantis* in Gewebe- und Organproben

Bei der Schlachtung, 123 Tage nach der Infektion, wurde ersichtlich, dass in nahezu allen untersuchten Organen, mit Ausnahme der fleischhygienisch wichtigen Organe Leber, Milz und Muskel, *S. Infantis* aufzufinden war. Dabei betraf dies bei 85,7% der Tiere die Tonsillen, Mandibularlymphknoten und das Ileum. Diese Ergebnisse bieten lebensmittelhygienisch wichtige Hinweise, denn tatsächlich wird hiermit deutlich, dass vorrangig die Verdauungsorgane und die für die immunologische Abwehr wichtigen Organe mit Salmonellen kolonisiert waren, wobei allerdings die Gefahr einer Kontamination der lebensmittelhygienisch bedeutsamen Organe durch den Schlachtprozess nicht ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse decken sich weitestgehend mit denen von FEDORKA-CRAY et al. (1994), die während einer Schlachtung über 90% der verabreichten Salmonellen in den

mesenterialen Lymphknoten, Tonsillen, dem Caecum und dem Kot nachweisen konnten. DAVIES (2004) postulierte, dass unterschiedliche *Salmonella*-Serovare eine unterschiedliche Verteilung im Tierkörper zeigen. *S. Typhimurium* vario Copenhagen wies eine stärkere Affinität zu den Mesenteriallymphknoten auf, *S. Derby* hingegen war eher im Caecum auffindbar. *S. Infantis* zeigt in den vorliegenden Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede in der Besiedlung von Mesenteriallymphknoten oder Caecum. Dennoch wird bei *S. Infantis* deutlich, dass neben der häufigsten Eintrittsstelle der Salmonellen (Tonsillen, Mandibularlymphknoten) eher in den unteren Darmabschnitten Salmonellen nachgewiesen werden konnten. Hier lässt sich vermuten, dass die Salmonellen durch die Magenpassage zum großen Teil abgetötet werden, sich im noch relativ sauren Milieu des vorderen Darmabschnittes nicht weiter vermehren können und erst in den letzten zwei Dritteln des Darmes ihren Manifestationsort finden. Durch Laktulose- und Säureeinsatz im Futter könnte eine deutlich verminderte Aufnahme von Salmonellen mit dem Futter (MATLHO et al. 1997; AL TARAZI und ALSHAWABKEH 2003) und Verbreitung im Darm gewährleistet werden (SCHUMANN 2002; KAMPHUES et al. 2003). Normalerweise sollte *S. Infantis* nicht außerhalb des Darmes aufzuweisen sein, da es sich um einen nicht oder wenig invasiven Keim handelt. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass es sich bei *S. Infantis* nicht immer um einen solchen schwach virulenten Keim handelt.

5.3 Serologischer Nachweis von *S. Infantis*

Der serologische Nachweis von *S. Infantis* wurde mit den vier derzeit nach §17c des TSeuchG zugelassenen indirekten ELISA-Testsystemen anhand von Fleischsaft- und Blutserumproben durchgeführt.

5.3.1 Verlauf der Antikörpertiter während des Untersuchungszeitraumes

In der Literatur sind verschiedene Auffassungen zur Induktion spezifischer Antikörper (Serokonversion) auffindbar. Im Blutserum lassen sich Antikörper ca. eine Woche nach erfolgter Salmonellen-Infektion nachweisen, wobei sich die Nachweisbarkeit über einen Zeitraum von 10 oder mehr Wochen erstrecken kann (HOLT 2000). Die Antikörper sind auch häufig dann noch nachweisbar, wenn sich die Kultur wieder negativ darstellt (HOLT 2000; BELOEIL et al. 2003). Dabei variiert die Intensität der Antikörperbildung je nach Antigen, wobei das Maximum schneller oder langsamer erreicht werden kann. Ebenso variiert auch die

Antikörper-Spezifität. Anti-LPS gerichtete Immunglobuline bilden meist hohe serologische Kreuzreaktionen aus, so dass es nach Reinfektion durch einen Boostereffekt zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort kommen kann (HOLT 2000). Nach NIELSEN et al. (1995) gibt es innerhalb des Tierkörpers Unterschiede im Zeitpunkt des Auftretens der Serokonversion, sowie der Ausprägung und dem Anhalten einer serologischen Antwort. Die Höhe der Antikörpertiter hängt zudem vom Serovar ab.

5.3.1.1 Salmotype® Pig STM-WCE™

Bei dem Salmotype® Pig STM-WCE™ handelt es um einen Testkit zum Nachweis von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern gegen *Salmonella* Typhimurium in Serum-, Plasma- und Fleischsaftproben von Schweinen (ANONYMUS 2006). Somit ist die eigentliche Bestimmung des Tests nicht die Detektion von Infektionen mit anderen *Salmonella*-Serovaren. Die Mikrotiterplatten des Test-Kits sind mit einem speziellen Vollzellysat-Antigen (WCE – Whole Cell Extract) von *Salmonella* Typhimurium beschichtet, an welche *Salmonella* Typhimurium-spezifische Antikörper einer positiven Serumprobe während der Inkubationsphase binden. Nach LEHMANN et al. (2004) erfasst das Testsystem die unterschiedlichen Immunglobuline nach erfolgter Infektion. Somit ist der Infektionsverlauf unter SPF-Bedingungen und in Feldversuchen durch IgM, IgA und IgG gut darstellbar und die Immunreaktion damit gut nachvollziehbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit offenbaren, dass auch *S. Infantis* spezifische Antikörper in hohem Maße an das Vollzellysat-Antigen von *S. Typhimurium* binden. Der Salmotype® Pig STM-WCE™ ist also auch geeignet, gegen *S. Infantis* gerichtete Antikörper im Blutserum und Fleischsaft zu erkennen. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei diesem ELISA um einen Test-Kit handelt, welcher mit einem Vollzellysat-Antigen von *S. Typhimurium* beschichtet ist. Die verschiedenen *Salmonella*-Serovare weisen gemeinsame serovarübergreifende Antigene auf, wodurch es zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern verschiedener *Salmonella*-Serovare kommen kann. Dies hängt damit zusammen, dass die Lipopolysaccharide (LPS) der Antigene aus dem hydrophoben Lipid-A-Teil und dem hydrophilen Polysaccharidteil (PS) bestehen, wobei sich der PS-Teil in eine konstante Kern-Region, die bei allen *Enterobacteriaceae* ähnlich ist, und ebenso in den variablen O-Antigen-Teil unterteilt, der spezifisch für die Serotypen ist (RIETSCHHEL et al. 1994; HOLST et al. 1998). Durch den konstanten PS-Teil und durch die Tatsache, dass jedes Serovar mehrere O-Antigene besitzt, ließ sich vermuten, dass auch gegen *S. Infantis* gerichtete Antikörper durch

den Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] detektiert werden können, was mit unseren Ergebnissen bestätigt wurde. Ebenso spielen die zytoplasmatischen Proteine eine Rolle, die zu einem größeren Antigenspektrum führen, wodurch die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass verschiedene Serovare gleiche Antigene besitzen. Es ist also zu erwarten, dass man mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ebenso in der Lage ist Antikörper anderer lebensmittelhygienisch bedeutsamer *Salmonella*-Serovare zu erkennen. Weiterführende Untersuchungen hierzu sind noch nötig bzw. werden derzeit durchgeführt. Jedoch kann es durch gemeinsame Antigene auch zu Kreuzreaktionen mit anderen *Enterobacteriaceae* kommen, was somit noch ungeklärte Fragen zur Testspezifität aufwirft. Laut Gebrauchsanweisung des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] können *Salmonella* Typhimurium-Antikörper in der Primärantwort bis vier Tage nach einer frischen Infektion nicht nachgewiesen werden. Auch LEHMANN et al. (2004) postulierte, dass IgG erst nach 7-14 Tagen *p.i.* gebildet wird, und somit erst spät im Infektionsgeschehen, wenn die akute Phase der Erregerausscheidung schon wieder vorüber ist, auftritt (GIBSON et al. 2001; ROESLER et al. 2005). Es ist davon auszugehen, dass der Zeitpunkt des Auftretens der Immunglobulinklassen im Blutserum unterschiedlich ist, wobei zuerst IgM und dann IgA nachzuweisen sind (HOLT 2000; TIZARD 2004). LEHMANN (2004) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass IgM schon nach 1-3 Tagen im Serum nachweisbar ist, während dies bei IgA und IgG erst nach 7-14 Tagen der Fall ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse korrelieren nicht vollständig mit diesen Erkenntnissen aus der Literatur und zeigen (Abbildung 12), dass gegen *S. Infantis* gerichtetes IgG bereits am 4. Tag nach der Infektion bei 25% der Tiere im Blut nachweisbar ist. Am 10. Tag *p.i.* betrifft dies 100% der Tiere. Dies bestätigt die durch ROESLER (2007) gemachten Beobachtungen bei *S. Thyphimurium* infizierten Tieren mittels einem Voll-Zell-Antigen basierten Referenzstandard-ELISA. Die Ursache besteht wahrscheinlich darin, dass die zytoplasmatischen Antigene des Vollzellsat-Antigen-ELISA kreuzreaktiv mit anderen *Enterobacteriaceae* sind, deren Anikörperreaktion durch die Infektion im Rahmen des Versuchs stark geboostert werden. Der durch *S. Infantis* hervorgerufene Antikörperspiegel von IgG und IgM liegt in den vorliegenden Ergebnissen meist signifikant höher als der von IgA. Beim Schwein sind im Blutserum meist zu 85% IgG, zu 12% IgM und zu 3% IgA-Antikörper nachweisbar (TIZARD 2004). Zu den Halbwertszeiten der Immunglobuline im Serum sind in der Literatur unterschiedliche Angaben auffindbar. Nach HOLT (2000) ist ein langsamer Abfall von IgM und IgA erkennbar, während IgG längere Zeit im Serum nachweisbar ist. LEHMANN et al. (2004) zeigte mit seinen Ergebnissen, dass der IgA-Gehalt 21 Tage *p.i.* abfällt, während IgM und IgG

noch bis zu 2 Monate nach erfolgter Infektion nachweisbar sind. Dies kongruiert mit den Ergebnissen von STEINBACH et al. (2003). Hierbei erklärt sich der Abfall des IgA-Gehaltes durch den Transfer des IgA an die Schleimhautoberfläche (LEHMANN 2004). Bis auf den 81. und 88. Tag *p.i.* liegt der IgA-Titer für *S. Infantis* bis auf Einzeltiere sehr niedrig. Dies könnte man zum einem mit dem schnellen Transfer des IgA an die Schleimhautoberfläche erklären. Zum anderen liegt jedoch die Vermutung nahe, dass eine Reinfektion in der Zeit zwischen den Probenentnahmen (1 Woche) erfolgte, die IgA-Titer in dieser Zeit anstiegen und zum nächsten Probenentnahmezeitpunkt wieder abgesunken waren. Um dies zu eruieren, müsste eine serologische Untersuchung in einem deutlich geringeren Abstand als einer Woche erfolgen und mittels Untersuchung der schleimhautständigen Plasmazellen im ELISPOT-Assay erfolgen. Im Laufe der Untersuchungen wurde ebenso offenbar, dass die Antikörpertiter der einzelnen Isotypen über den Versuchszeitraum undulierend verlaufen, wobei die Titer gegen Ende des Infektionsversuches besonders hoch lagen. Dies könnte man zum einem, für IgM, damit erklären, dass ein Antikörper mit vielen Bindungsstellen häufig in der Lage ist, mit anderen Keimen kreuzzureagieren und somit einen steigenden Antikörpertiter aufweist. Zum anderen ist es ein Grundprinzip, dass es nach Reinfektionen zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort kommt (PLAYFAIR 1995; HOLT 2000; ROITT et al. 2001). Umgruppierungen, schlechtes Klima und sonstige Maßnahmen bedeuten für die Tiere Stress (BLECHA et al. 1985), in dessen Folge die immunologischen Abwehrmechanismen geschwächt werden (SEIDLER et al. 2001) und die Ausscheidung steigen kann (ROESLER et al. 2005). In dieser Versuchsgruppe erfolgte der Stress z.B. durch Futterwechsel, Rankämpfe oder Blutprobenentnahmen, wodurch wiederholt eine Ausscheidung von Salmonellen mit dem Kot forciert wurde. Da vermutlich alle Tiere mit den Faezes in Berührung kamen, liegt es nahe, dass dies wiederholt zu Reinfektionen führte. Daraus resultierte eine stärkere Immunantwort, welche in dieser Untersuchung serologisch nachgewiesen wurde. Ein erhöhter IgA-Antikörpergehalt im Serum, als Zeichen einer Reinfektion, konnte in diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Mögliche Gründe wurden bereits erläutert. Letztendlich persistiert IgG über Monate im Serum (LEHMANN et al. 2004), woraus bei erfolgter Reinfektion durch sekundäre Immunantwort und „Booster“-Effekt auch eine Kumulation der Antikörper erfolgen konnte und somit ein höherer Titer gegen Ende des Versuchszeitraumes vorlag. Insgesamt bestätigt sich die Aussage, dass die Subspezies I von *S. enterica* durch eine sehr variable Ausscheidungsdynamik gekennzeichnet ist, wobei Prävalenz und Serotypenprofil je nach Tiergruppe und Infektionszeit variieren (DAVIES 1999; FUNK et al. 2001b; ROSTAGNO et al. 2004).

5.3.1.2 LPS-ELISA

Das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] ist laut Gebrauchsanweisung zum Nachweis von Antikörpern gegen *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Cholerasuis und *Salmonella* Infantis bei Schweinen geeignet. Die Mikrotiterplatten sind mit einer Mischung von inaktivierten *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Cholerasuis-Polysaccharid Antigen beschichtet. Damit sind die O-Antigene 1, 4, 5, 12 (*S.* Typhimurium) und 6, 7 (*S.* Cholerasuis) erfasst. Somit ergeben sich durch die O-Antigene 6 und 7 gemeinsame Komponenten mit den O-Antigenen (6, 7, 14) von *S.* Infantis. In diesem Versuch wurde bestätigt, dass das Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] Antikörper gegen *Salmonella* Infantis nachweist. Der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] dient ebenfalls zum Nachweis von Antikörpern gegen alle zoonotischen Salmonellen beim Schwein. Hierbei wurden die Mikrotiterplatten mit LPS Antigen der Serogruppen B, C1 und D beschichtet. Er stellt laut CAMITZ (2002) die Serokonversion der Serovare *S.* Livingston, *S.* Panama, *S.* Brandenburg und *S.* Typhimurium dar. *Salmonella* Infantis gehört der Gruppe C an und müsste somit von diesem Testsystem ebenfalls erfasst werden, was durch diese Untersuchungen bestätigt wurde. Auch der Salmotype[®] PigScreen[™] stellt ein Nachweissystem für Antikörper gegen alle zoonotischen Salmonellen beim Schwein dar. Laut Gebrauchsanweisung werden Antikörper gegen die O-Antigene 1, 4, 5, 6 und 12 erfasst. *S.* Infantis enthält u.a. die O-Antigene 6 und 7. Auch hier zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass *S.* Infantis durch den Salmotype[®] PigScreen[™] detektiert wurde. Somit ist man mittels der drei getesteten LPS-ELISA-Systeme prinzipiell in der Lage, Antikörper gegen *S.* Infantis beim Schwein zu erkennen. Jedoch detektieren die untersuchten LPS-ELISAs ausschließlich Antikörper vom Isotyp IgG. Der Isotyp IgG wird bei einer Salmonelleninfektion innerhalb von 7-14 Tagen *p.i.* gebildet und ist anschließend über ca. 2 Monate im Serum nachweisbar (ROESLER 2007; LEHMANN et al. 2004). Betrachtet man vergleichend zu dieser Aussage die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so erkennt man diesbezüglich eine Übereinstimmung. Auch hier wurden spezifische Antikörper mittels der drei LPS-ELISA erst ab dem 10. Tag nachgewiesen. IgG wird also erst spät im Infektionsgeschehen gebildet, wenn die Phase der akuten Infektion mit massiver Erregerausscheidung schon wieder vorbei ist (GIBSON et al. 2001; ROESLER et al. 2005). Die drei untersuchten LPS-ELISA zeigten ebenso einen kontinuierlichen, undulierenden Anstieg der Antikörpertiter. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis liegen auch hier in einer schnelleren und stärkeren Immunantwort durch „Boosterung“ bei Reinfektion, sowie in einer vermehrten stressbedingten Ausscheidung von Salmonellen. Das Enterisol[®] Salmonellen-

Diagnostikum™ weist über den gesamten Versuchszeitraum die höchsten Antikörpertiter nach, wobei es ebenso, als erster der drei getesteten LPS-ELISA, Antikörper detektiert. Es liegt die Vermutung nahe, dass dies in der Antigen-Kombination von *S. Typhimurium*- und *S. Cholerasuis*-Antigen begründet liegt. Die anderen zwei getesteten ELISA verhalten sich in ihrer Reaktion nahezu kongruent, was wahrscheinlich auf der beinahe identischen Zusammensetzung ihres Ag-Gemisches beruht.

5.4 Sensitivitäten der untersuchten ELISA-Systeme bei experimenteller *S. Infantis* Infektion beim Schwein

Für die optimale Sensitivität eines diagnostischen ELISA sollten Antigene solcher Serovare auf die Mikrotiterplatte gebracht werden, die in der jeweiligen geographischen Region am häufigsten verbreitet sind (HARRIS 2003). Diesbezüglich erfüllen die vier in Deutschland zugelassenen ELISA-Systeme die Voraussetzungen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde deutlich, dass der Salmotype® Pig STM-WCE™ die höchste Sensitivität von allen getesteten ELISA-Systemen, beim Nachweis einer *Salmonella* Infantis-Infektion beim Schwein, erreicht. Es ist davon auszugehen, dass dieses Ergebnis in der Bestückung der Mikrotiterplatte mit einem Ganzzellysate begründet liegt. Der HerdChek® Swine Salmonella™ dagegen weist die niedrigste Sensitivität auf. Die Diskrepanz der Sensitivitäten kann durch den unterschiedlichen Testaufbau begründet werden, wobei sich der Aufbau der LPS-ELISA grundsätzlich von dem des Salmotype® Pig STM-WCE unterscheidet. Derartige Abweichungen der Sensitivitäten zwischen verschiedenen ELISA-Systemen wurden bereits in der Vergangenheit beobachtet. Dabei startete auch VAN DER HEIJDEN (2001) 2001 einen internationalen Ringversuch. Es wurden mehrere indirekte, auf LPS-Antigenen basierende ELISAs bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität verglichen. Neben verschiedenen „in-house“ ELISA wurden auch mehrere kommerziell verfügbare Testkits einbezogen. Bei der Spezifität konnte eine zufrieden stellende Übereinstimmung zwischen den Testkits festgestellt werden. Jedoch zeigten sich große Differenzen hinsichtlich der Sensitivität. Somit wurde offenbar, dass eine deutliche Notwendigkeit besteht, international verfügbare Referenzseren zur Testevaluierung zur Verfügung zu stellen. Die Aussagen VAN DER HEIJDENs (2001) hinsichtlich der Sensitivität der hier getesteten ELISA-Systeme können bestätigt werden. Auch hier mangelt es an einer Übereinstimmung

der Sensitivität in den verschiedenen Abschnitten des Infektionsverlaufes. Jedoch führen die Sensitivitäten aller getesteten ELISAs gegen Ende des Versuches, dem herkömmlichen Schlachtzeitpunkt, nach den derzeitigen Kriterien des QS-Systems und der Schweine-Salmonellen-Verordnung zur Einstufung des „Bestandes“ (Versuchsgruppe) in Kategorie III. Damit decken sich diese Ergebnisse mit den Untersuchungen von BLAHA (2003c), welcher eruierte, dass die drei ELISA-Testkits der Firmen Labor Diagnostik Leipzig, IDEXX und Boehringer/Ingelheim zu gleichen Ergebnissen bezüglich der Einteilung der Schweinebestände in die drei Risikogruppen führte. Jedoch erfolgte in den ersten drei Monaten, nach der Infektion mit *S. Infantis*, die Einstufung der Testergebnisse der untersuchten ELISA-Systeme, in unterschiedliche Risikogruppen nach den derzeitigen Kriterien des QS-Systems und der Schweine-Salmonellen-Verordnung. Während durch den Salmotype[®] PigScreen[™] und den HerdChek[®] Swine Salmonella[™] der Versuchsbestand der Kategorie II zugeordnet wurde, war dies mittels Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] und Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] die Kategorie III. Somit besteht die Gefahr, dass eine Infektion, welche zu einem späteren Zeitpunkt der Mast erfolgt ist, zu einer unterschiedlichen Einteilung der Mastbestände in die Risikogruppen führt. Daher stellt der Salmotype[®] Pig STM-WCE[™], besonders in Sanierungsprogrammen und epidemiologischen Studien als Ig-Klassen-differenzierendes ELISA-System, ein sehr gutes zusätzliches Diagnostikum dar.

5.4.1 Der Einfluss des Cutoff-Wertes auf die Sensitivität

Wie bereits diskutiert, kann durch Diskrepanzen der Test-Sensitivitäten zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Herdendiagnostik kommen und damit eventuell zu einer nicht übereinstimmenden Zuordnung in die Kategorien des QS-System und der Schweine-Salmonellen-Verordnung. Somit besteht die Gefahr, dass *Salmonella*-infizierte Schweine von einigen Testsystemen nicht detektiert und infolgedessen nicht nach Schweine-Salmonellen-Verordnung gemäßregelt werden können. Dies birgt zudem die Gefahr, dass der Landwirt bei Kenntnis der Testsensitivitäten und der im Bestand zirkulierenden Serovare, diejenigen Labore bevorzugen könnte, welche einen eventuell vorteilhafteren ELISA mit einer niedrigeren Sensitivität zur Verfügung haben..

STEINBACH (2002) postulierte, dass Cutoff-Werte von 10 bis 40 OD% eine „Auseinandersetzung“ mit Salmonellen vermuten lassen, während Werte von 40 OD% als definitiv positiv angesehen werden können. Niedrigere Werte können auch durch Antikörper

gegen andere Antigene, so genannte unspezifische Reaktionen oder Kreuzreaktionen, verursacht werden. 40 OD% entspricht dem nach QS-System und der Schweine-Salmonellen-Verordnung vorgeschriebenen Cutoff-Wert. Für die verschiedenen Testsysteme existiert dennoch ein spezifischer Cutoff-Wert, welcher die Tiere als *Salmonella*-positiv oder -negativ einstuft. Somit kann durch die Wahl des Cutoff-Wertes, die Anzahl an positiven Tieren variiert werden. Ein niedriger Cutoff-Wert führt zu einer höheren Gewichtung der Sensitivität gegenüber der Spezifität, ein hoher Cutoff-Wert zur höheren Spezifität gegenüber der Sensitivität (GREINER und GARDNER 2000). Betrachtet man die Ergebnisse des HerdChek[®] Swine Salmonella[™] und des Salmotype[®] PigScreen[™], so wird auch hier deutlich, dass mit einem niedrigen Cutoff-Wert, die Sensitivität steigt und somit mehr Tiere als *Salmonella*-positiv erkannt werden. Der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] wies demnach mittels des vom Hersteller vorgegebenen, wissenschaftlich ermittelten testinternen Cutoff-Wertes die höchsten Sensitivitäten der LPS-ELISAs auf. Unter Nutzung des Cutoff-Wertes nach QS-System und Schweine-Salmonellen-Verordnung, lag die Sensitivität des HerdChek[®] Swine Salmonella[™] jedoch im Vergleich mit allen vier getesteten ELISA-Systemen am niedrigsten. In den vorliegenden Untersuchungen ist ebenso ersichtlich, dass die Sensitivitäten unter Nutzung des Cutoff-Wertes nach QS-System generell wesentlich niedriger lagen und die getesteten ELISA-Systeme somit mit *Salmonella* Infantis-infizierte Schweine über sehr große Zeiträume nach erfolgter Infektion nicht detektieren konnten. Dagegen liefert der Cutoff-Wert von 10 bzw. 20 OD%, welcher durch die Hersteller anhand wissenschaftlicher Kriterien ermittelt und angegeben ist, wesentlich höhere Detektionsraten. Es sollte also zukünftig in Betracht gezogen werden, so wie z.B. bereits in Dänemark geschehen, den Cutoff-Wert der *Salmonella*-Kontrollprogramme auf 20 oder 10 OD% herabzusetzen, um sicher zu gehen, möglichst viele infizierte Tiere auch zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Infektion zu detektieren.

5.4.2 Vergleich des Antikörpertiters und der Sensitivität der einzelnen ELISA-Systeme in Endserum und Fleischsaft

Mittels Salmotype® Pig STM WCE™ konnte im Fleischsaft im Vergleich zum Endserum ein signifikant höherer Antikörpertitergehalt der einzelnen Isotypen nachgewiesen werden. Dies ist von wesentlichem Einfluss auf die Sensitivität des Tests. Während mittels Fleischsaft jedes infizierte Tier (100%) erkannt wurde, lag beim Nachweis mittels Serum nur eine Sensitivität von 85,7% vor, wobei sich die Werte jeweils unter Einbeziehung aller AK-Isotypen ergeben (Tabelle 5). Betrachtet man die einzelnen Isotypen, so stellt man bei IgA sogar einen signifikanten Unterschied fest. Mittels Endserum wird keines der positiven Tiere detektiert, während im Fleischsaft 85,7% der Tiere als IgA positiv getestet wurden. Begründet werden kann der höhere Antikörpertitergehalt im Fleischsaft durch die Vermutung, dass verschiedene Antikörper-Isotypen nicht in gleichem Maße im Fleischsaft vorkommen, wie im Serum. Dies betrifft insbesondere IgM und IgA, wobei bekannt ist, dass IgA an die Schleimhautoberfläche wandert und IgM meist nur zu frühen Zeitpunkten der Infektion im Serum nachweisbar ist. Fleischsaft gilt als diagnostisch verwertbare Substanz, da es sich um eine physiologische Flüssigkeit handelt, welche sich aus Lymphe, freigesetzter intrazellulärer Flüssigkeit und aus dem Gefäßsystem ausgetretenem Serum zusammensetzt (NIELSEN 1998). Für die Bestandsdiagnostik und Herdeneinstufung nach QS-System und den Kriterien der Schweine-Salmonellen-Verordnung gilt jedoch, dass es mittels Salmotype® Pig STM-WCE™, unter Nutzung von Fleischsaft oder Serum, zu einer einheitlichen Kategorieeinstufung der Versuchsgruppe kommt. Sollten allerdings Einzeltiere diagnostisch betrachtet werden, hätte unterschiedliche Zuordnungen in die Kategorien zur Folge. Die LPS-ELISA zeigen bei Anwendung der durch die Hersteller vorgegebenen testinternen Cutoff-Werte im Antikörpertiterverlauf dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Endserum und Fleischsaft. Dies lässt sich dadurch erklären, dass hierbei nur IgG-Antikörper gemessen werden und die unterschiedlichen Eigenschaften der Antikörper-Isotypen somit keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Bei Errechnung der Sensitivität konnte jedoch beim HerdChek® Swine Salmonella™ mittels Blutserum, unter Nutzung des Cutoff-Wertes von 40 OD%, eine doppelt so hohe Sensitivität nachgewiesen werden, wie im Fleischsaft. Unter Nutzung des vom Hersteller empfohlenen Cutoff-Wertes stimmen die Sensitivitäten des HerdChek® Swine Salmonella™ in Endserum und Fleischsaft hingegen überein. Das Enterisol® Salmonellen-Diagnostikum™ und der Salmotype® PigScreen™ zeigen dagegen auch bei Anwendung des Cutoff-Wertes von 40

OD% keine Unterschiede der Sensitivität zwischen Fleischsaft und Endserum und bestätigen somit die Aussage, dass Ergebnisse von *ante mortem* gezogenen Blutproben und Fleischsaftproben meist übereinstimmen (NIELSEN et al. 1998). LEYK (2003) postulierte, dass eine Diagnostik mittels einer um zwei Stunden nach Schlachtung verzögerten Muskelfleischentnahme und Blutproben, welche ca. 10 Tage vor Schlachtung entnommen wurden, keine Auswirkung auf die Ergebnisse zeigt. Durch HEIN und ALT (2004) wurde jedoch nachgewiesen, dass die Korrelation der Ergebnisse der Untersuchung von Fleischsaft und Blutserum mit unterschiedlichen Tests in unterschiedlichen Laboratorien nur schwach signifikant war. Die Ergebnisse des Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] und der LPS-ELISAs bei Anwendung von 40 OD% bestätigen diese Beobachtung. Gründe hierfür können in einer Blutkontamination bei Probennahme oder in Verarbeitungsfehlern liegen. Im Endeffekt scheint Blutserum ein besseres Probenmaterial zu liefern und sollte künftig verwendet werden.

5.4.3 Serologische und bakteriologische Diagnostik im Vergleich

In jedem Salmonellenüberwachungsprogramm spielt die Diagnostik eine entscheidende Rolle. Als optimal stellt sich ein Verfahren dar, welches durch hohe Spezifität und Sensitivität, leichte und schnelle Durchführbarkeit, geringe Kosten und das Untersuchen mehrerer Proben gleichzeitig gekennzeichnet ist (NIELSEN und BAGGESEN 1997). Diese Voraussetzungen sind nachweislich durch die hier getesteten ELISA-Systeme erbracht worden. Dagegen war die bakteriologische Untersuchung mit einem wesentlich größeren Zeit- und Materialaufwand verbunden. In dänischen und deutschen Untersuchungen fand man einen Zusammenhang zwischen positiven Befunden in der Kultur und der serologischen Prävalenz sowie umgekehrt (GANTER et al. 1998; STEGE et al. 1997), wobei die Anzahl kultureller Befunde umso höher lag, je höher die serologische Herdenprävalenz war (BAUM 1998; CHRISTENSEN et al. 1998; STEINBACH 2002). Dieser Zusammenhang wurde in diesen Ergebnissen tatsächlich nachgewiesen und in den vorangegangenen Abschnitten bereits diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nochmals deutlich, dass sich die Höhe der Ausscheidungsrate von Salmonellen mit dem Kot und die Sensitivität der einzelnen Tests an dem jeweiligen Untersuchungstag meist abwechselten, was auf den nötigen Zeitraum der Serokonversion zurückzuführen ist. Dies ist nochmals für beide diagnostischen Methoden vergleichend in Abbildung 31 dargestellt. Es liegt also ein undulierender Verlauf vor, der die zeitliche Diskrepanz zwischen

der Salmonellen-Ausscheidung und der Bildung spezifischer Antikörper darstellt und somit die Lücken der bakteriologischen und serologischen Diagnostik erklärt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde ebenfalls die Sensitivität der einzelnen ELISA-Systeme in Bezug auf die bakteriologisch positiven Tiere untersucht. Dabei war ersichtlich, dass sich die Sensitivitäten beider Nachweisverfahren kaum unterschieden. Da jedoch durch frühere Untersuchungen nachweislich ein Zusammenhang zwischen Bakteriologie und Serologie festgestellt wurde, wird die Serologie in den Monitoringprogrammen gerechtfertigt. Dies wird ebenso dadurch unterstützt, dass ELISA-Technik eine schnellere und kostengünstigere diagnostische Untersuchungsmethode darstellt (CHRISTENSEN et al. 1998; GIBSON et al. 2001). Dadurch wird innerhalb der Salmonellen-Monitoringprogramme auch den landwirtschaftlichen Betrieben finanziell entgegen gekommen. Hinzu kommt, dass es mit der serologischen Untersuchung auch möglich ist, latente Träger zu erkennen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Antikörpern höher, als die des direkten Erregernachweises in den Faezes oder Lymphknoten (STEINBACH et al. 2002).

6 Zusammenfassung

Claudia Matthies

Vergleichende Evaluierung der in Deutschland zugelassenen ELISA-Testsysteme zur *intra vitam* und *post mortem* Diagnostik der porzinen *S. Infantis* Infektion

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

Eingereicht im Juni 2008

92 Seiten, 31 Abbildungen, 5 Tabellen, 153 Literaturstellen

Schlüsselwörter: *Salmonella* Infantis, ELISA, Schweinefleisch, Diagnostik, Lebensmittelinfektion, Schweine-Salmonellen-Verordnung

Weltweit zählt die Salmonellose zu den am häufigsten vorkommenden Zoonosen und auch in Deutschland kommt ihr zunehmend eine sozialökonomische Bedeutung zu. Dabei stellen die maßgeblichen Übertragungs- und Infektionsquellen kontaminiertes Wasser und kontaminierte Lebensmittel dar, bei denen schätzungsweise 20 % auf kontaminiertes Schweinefleisch zurückzuführen sind. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer Salmonellenbekämpfung. In den dafür geschaffenen gesetzlichen Grundlagen spielt vor allen Dingen der serologische Nachweis einer Salmonelleninfektion eine entscheidende Rolle. Dafür existieren derzeit in Deutschland vier nach § 17c des TSeuchG zugelassene ELISA-Testsysteme. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine vergleichende Evaluierung dieser ELISA-Testsysteme zur serologischen Diagnostik von *S. Infantis* beim Schwein. Um die Tests zu evaluieren, wurden 19 Läufer Schweine intragastral mit *S. Infantis* infiziert und über einen Untersuchungszeitraum von 123 Tagen serologisch mit allen vier ELISAs untersucht. Dabei erfolgte zeitgleich eine bakteriologische Untersuchung. Obwohl *S. Infantis* zu den schwach

virulenten Erregern zählt, zeigten alle Probanden eine deutliche Klinik, die sich überwiegend in mittelgradiger Diarrhoe äußerte. Durch die bakteriologische Untersuchung wurde offenbar, dass alle Schweine bis zum Ende des Versuchszeitraumes eine intermittierende Ausscheidung von *S. Infantis* zeigten. Ebenso war bei allen Tieren eine Serokonversion nachweisbar, welche sich bei den angewandten Tests jedoch in deutlicher Diskrepanz der Testsensitivitäten äußerte. Zum Beispiel ergab die ermittelte Testsensitivität des Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] am 53. Tag mittels vorgeschriebenen Cutoff-Wertes nach Schweine-Salmonellen-Verordnung eine Sensitivität von 20%, während diese bei dem isotypspezifischen Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA bei 93,3% lag. Während der Salmotype[®] PigScreen[™] immerhin eine Sensitivität von 6,7% zeigte, erwies sich der HerdChek[®] Swine Salmonella[™] an diesem Tag als nicht sensitiv. In der gesamten Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass sich der isotypspezifische Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA zur serologischen Diagnostik von *S. Infantis* am besten eignete, während die drei LPS-ELISA erst sehr spät positiv reagierten. Die Sensitivitätsverluste erwiesen sich als besonders stark, wenn die Auswertung der optischen Dichte durch den nach Schweine-Salmonellen-Verordnung angewandten Cutoff-Wert von 40 OD% erfolgte. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Ergebnisse der Fleischsaftuntersuchung nicht immer mit denen des Endserums korrelierten. Insgesamt ist der Einsatz des Cutoff-Wertes von 40 OD% als kritisch zu betrachten und es stellt sich die Frage, ob es im Sinne des Verbraucherschutzes, nicht günstiger wäre, den Cutoff-Wert auf 20 oder 10 OD % herabzusetzen, wie dies inzwischen auch in Dänemark mit Erfolg durchgeführt wurde. Abschließend ist feststellbar, dass sich die Diagnostik von *S. Infantis* beim Schwein mit den vorgeschriebenen Testsystemen als schwierig erweist, da teilweise geringe Sensitivitäten vorlagen.

Summary

Claudia Matthies

Comparing Evaluation of the German ELISA-Testsystems for intra vitam and post mortem diagnostics of porcine *Salmonella* Infantis infection.

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

Submitted in June 2008

92 pages, 31 figures, 5 tables, 153 references

Keywords: *Salmonella* Infantis, ELISA, pig, pork, antibodies

Salmonellosis is one of the most appearing zoonosis worldwide and also in Germany it is the leading cause of food poisoning in human. One of the most important sources of infections are contaminated pork in approximately 20 % of the cases. This shows the necessity of *Salmonella*-reduction programs. The German monitoring programs against *Salmonella* in swines are based on enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) detecting antibodies in serum or meat juice. Therefore in Germany 4 ELISA-systems are accredited according to §17c TseuchG. The object of this study was the comparative evaluation of these four indirect *Salmonella* ELISA-tests approved in Germany to detect *Salmonella* Infantis infection in swine. Three tests (A-C) are based on LPS-antigen and directed against specific IgG-antibodies. The fourth test (D) bases on a whole-cell-lysate antigen and discriminates between *Salmonella* specific IgA-, IgM- and IgG-antibodies. Nineteen 6 weeks old weaning pigs were orally infected with *S. Infantis* and observed during an observation period of 123 days. Clinical and bacteriological parameters were monitored and serum samples obtained at regular intervals, as well as meat juice samples taken at slaughter, were examined by the respective ELISA systems. Although *S. Infantis* is one of the mild virulent *Salmonella* pathogens, all pigs had intense diarrhoe. As well the bacteriological analysis showed an

intermittent shedding of *S. Infantis* till the end of the study. A seroconversion was seen in all pigs, but there were large differences between the different ELISA-systems regarding the test sensitivity. For example at day 53 after infection, the sensitivity of the test Enterisol[®] Salmonellen-Diagnostikum[™] was 20 % using the 40 % OD Cutoff-value in contrast to the isotype specific Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA with 93,3%. The HerdChek[®] Swine Salmonella[™] detected no infected pig at this day, while the Salmotype[®] PigScreen[™] showed a sensitivity of only 6,7%. The whole study demonstrated, that the Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA was the most suitable Test-System for serological detection of *S. Infantis* infected pigs, whereas the LPS-antigen based ELISA-tests recognized a *S. Infantis* infection very late. The deficit of sensitivity was even higher by using the Cutoff-value of 40 % OD, which is currently required by the German *Swine Salmonellose Order*. Furthermore we could see, that the results of serumanalysis do not always correlate with meat juice analysis. Summarizing, the use of the 20 % OD Cutoff-value, like it was introduced in Denmark, would significantly increase the detection rates of the LPS-ELISA-systems. But finally, it was also obviously that all the ELISA-systems tested, showed large diagnostic gaps and only low sensitivities.

8 Literaturverzeichnis

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

Alban L, Stege H, Dahl J. The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program. Prev Vet Med. 2002;53(1-2);133-46.

Al Tarazi YH, Alshawabkeh K. Effect of dietary formic and propionic acids on *Salmonella pullorum* shedding and mortality in layer chicks after experimental infection. J Vet Med B. 2003;50;112-7.

Andrews WH. Wiley Award Address. Evolution of methods for the detection of *Salmonella* in foods. J AOAC Int. 1996;79(1);4-12.

Anonymus. Bekanntmachung der Leitlinien für ein Programm zur Reduzierung des Eintrages von Salmonellen durch Schlachtschweine in die Fleischgewinnung. Bundesanzeiger.1998;44;2905-6.

Anonymus. Annual report of zoonoses in Denmark 2001. Ministry of Food, Agriculture and Fisheries:2002;10.

Anonymus. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2002. Zusammengestellt vom Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen (NRL-E) im BfR:www.bgvv.de;2003.

Anonymus. Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut:2004;31.

Anonymus. Leitfaden für Programme zum Monitoring und zur Reduzierung von lebensmittelassoziierten Zoonoseerregern im Rahmen des QS-Prüfzeichens:I. Salmonellenmonitoring und -reduzierungsprogramm für die Schweinefleischerzeugung;2006a

Anonymus.QS-System:www.q-s.info;2006b

Anonymus. Salmotype[®] Pig STM-WCE[™] ELISA. Produktbeschreibung. Labor Diagnostik Leipzig GmbH:Leipzig;2006c

Anonymus. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. Deutsche Fassung EN ISO 6579:2002+A1:2007. International Organisation for Standardisation;2007

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

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

- Baggesen DL, Wegener HC. Phage types of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from production animals and humans in Denmark. *Acta Vet Scand.* 1994;35(4);349-54.
- Beloil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E et al. Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev Vet Med.* 2003;60(3);207-26.
- Baum DH, Harris DL, Nielsen B, Fedorka-Cray PJ. Epidemiologic studies of *Salmonella* in swine using culture and ELISA. Proceedings of the 5th IPVS Congress: Birmingham, England; 1998.
- Baum DH, Harris DL, Nielsen B. Serologic and bacteriological response of pigs infected with three serotypes of *Salmonella*. Proceedings of the 3rd Symposium on the Epidemiology and control of *Salmonella* in pork: Washington, USA; 1999.
- Beloil PA, Chauvin C, Proux K, Rose N, Queguiner S, Eveno E et al. Longitudinal serological responses to *Salmonella enterica* of growing pigs in a subclinically infected herd. *Prev Vet Med.* 2003;60(3);207-26.
- 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.
- Blaha T, Solano-Aguilar G, Pijuan C. The early colonization pattern of *S. Typhimurium* in pigs after oral intake. Proceedings of the 2nd international Symposium of the Epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Copenhagen, Denmark: 1997;71-3.
- Blaha T. Salmonellenmonitoring und -reduzierung in der landwirtschaftlichen Primärproduktion als Beitrag zum vorbeugenden Verbraucherschutz am Beispiel der Schweinefleischproduktion. *Lohmann Information.* 2003a;2;15-20.
- Blaha T. Was bringt die geplante Salmonellen-Verordnung?. *top agrar.* 2003b;2;10-11.
- Blaha T. Proficiency test of four *Salmonella* Antibody ELISA-Tests for their harmonization. Safepork, 5th International Symposium of the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork; 2003c.
- Blecha F, Pollmann DS, Nichols DA. Immunologic response of pigs regrouped at or near weaning. *Am J Vet Res.* 1985;46;1934-7
- Bisping W, Amtsberg G. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag; 1988;171-82.
- Boes J, Alban L, Bagger J, Mogelmose V, Baggesen DL, Olsen JE. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in slurry applied to clay soil on a Danish swine farm. *Prev Vet Med* 2005;69;213-28.
- Böhm R. Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 1993;100;275-8.

- Boyen F, Pasmans F, Donne E, Van Immerseel F, Adriaensen C, Hernalsteens JP, Ducatelle R, Haesebrouck F. The role of *Salmonella* pathogenicity island 1 and 2 in the invasion and growth of *Salmonella* Typhimurium in a porcine intestinal epithelial cell line. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Deutschland:2004;690.
- Busse M. Media for *Salmonella*. Int J Food Microbiol. 1995;26(1);117-31.
- Camitz A, Ballagi A, Shoberg R, Holmquist G. Serological Monitoring of *Salmonella* infection in swine using the HerdChek[®] *Salmonella* antibody ELISA:Iowa,USA;2002.
- Chen W, Martinez G, Mulchandani A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. Anal Biochem. 2000;280;166-72.
- Christensen J, Baggesen DL, Nielsen B, Stryhn H. Herd prevalence of *Salmonella* spp. in Danish pig herds after implementation of the Danish *Salmonella* Control Program with reference to a pre-implementation study. Vet Microbiol. 2002;88(2):175-88.
- Christensen J, Baggesen DL, Soerensen V, Svensmark B. Detection of *Salmonella* enterica in follow up pen-samples in pig herds with moderate or high prevalence. Proceedings of the 15th IPVS Congress. Birmingham, England1998:71.
- Clarke RC und Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles, C.L. und Thoen, C.O. (Hrsg.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Iowe State University Press, Ames:1993
- Dahl J. Cross-sectional epidemiological analysis of the relations between different herd factors and *Salmonella*-seropositivity. Proceedings of the 15th IPVS Congress:Birmingham,England;1998a.
- Dahl J. The effect of feeding non-heat-treated, non-pelleted feed compared to feeding pelleted, heat treated feed on the *Salmonella* seroprevalence of finishing pigs. Proceedings of the 15th IPVS Congress: Birmingham, England;1998b.
- Davies PR. Fecal sheeding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. Swine health Production.1995;7(5);231-4.
- Davies PR, Morrow WE, Jones FT, Deen J, Fedorka-Cray PJ, Gray JT. Risk of shedding *Salmonella* organisms by market-age hogs in a barn with open-flush gutters. J Am Vet Med Assoc. 1997;210(3);386-9.
- Davies PR. Fecal sheeding of *Salmonella* by a cohort of finishing pigs in North Carolina. Swine health Production.1999;7(5);231-4.
- Davies PR, Gebeyes WA, Funk JA, Turkson P. Observational evidence of differential translocation of *Salmonella* serovars to mesenteric lymphnodes of swine. Proceedings of the 18th IPVS Congress.Hamburg, Deutschland. 2004;2;652.
- Dediè K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K-J, Weinke T. Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Stuttgart:Enke Verlag;1993.
- Dorn C, Schroeter A, Helmuth R. Salmonellenvorkommen beim Schwein-epidemiologische Situation und Bewertung des Verbraucherschutzrisikos. Praktischer Tierarzt. 2003;84(12);930-6.

- Eld K, Gunnarsson A, Holmberg T, Hurvell B, Wierup M. *Salmonella* isolated from animals and feedstuffs in Sweden during 1983-1987. *Acta Vet Scand.*1991;32(2);261-77.
- Ellingson JL, Anderson JL, Carlson SA, Sharma VK. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Mol Cell Probes.*2004;18;51-7.
- Fang Q, Brockmann S, Botzenhart K, Wiedenmann A. Improved detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. *J Food Prot.* 2003;66;723-31.
- 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;63-71.
- Fedorka-Cray PJ, Whipp SC, Isaacson RE, Nord N, Lager K. Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Vet Microbiol.* 1994;41(4);333-44.
- Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Hofle MG, Guzman CA. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70;3618-23.
- Fluit AC, Widjojoatmodjo MN, Verhoef J. Detection of *Salmonella* species in fecal samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33;1046-7.
- Fransen NG, van den Elzen AM, Urlings BA, Bijker PG. Pathogenic micro-organisms in slaughterhouse sludge-a survey. *Int J Food Microbiol.* 1996;33;245-56.
- Funk JA, Davies PR, Nichols MG. Evaluation of sample weight for the isolation of *Salmonella* spp. from swine feces. *Proceedings of the 2nd international Symposium of the epidemiology and control of Salmonella in pork.* Copenhagen, Dänemark:1997;97-9.
- Funk JA, Davies PR, Gebreyes W. Risk factors associated with *Salmonella* enterica prevalence in three-site swine production systems in North Carolina, USA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001a;114(9-10);335-8.
- Funk JA, Davies PR, Nichols MA. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet Microbiol.* 2001b;83(1);45-60.
- Funk J. Pre-harvest food safety diagnostics for *Salmonella* serovars. Part 1: Microbiological culture. *J Swine Health Prd.* 2003;11(2);87-90.
- 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.
- Ganter M, Müller K, Tegeler R, Friedel K. Prevalence of *Salmonella* in finishing pigs of Northwest Germany. *Proceedings of the 5th IPVS Congress:*Birmingham, England; 1998.
- Gareis M. *Salmonellae* - A Survey. *Fleischwirtschaft.* 1995;45;954-57.

- Gibson K, Ritter L, Blaha T, Carlson A, Szaszak A, Maes D, Grass J, Harris-Turney I. Monitoring the dynamics of *Salmonella* prevalence in commercial swine herds. Proceedings of the 4th international Symposium on the Epidemiology and control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in pork. Leipzig:2001;274-80.
- Greiner M, Gardner IA. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med.* 2000;45(1-2):3-22.
- Hahn H, Falke D, Klein P. *Medizinische Mikrobiologie.* 2. Auflage. Berlin: Springer Verlag; 1994.
- Harris IT, Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Thomas LA, Ferris K. Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;210(3):382-5.
- Harris IT. Serologic basis for assessment of subclinical *Salmonella* infection in swine: Part 2. *J Swine Health Prod.*2003;11(6):300-3.
- Hartung M. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1998. *bgVV Hefte*:1999;9.
- Hein S, Alt M. Comparison of different sample sites in *Salmonella* monitoring in slaughter pigs. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Germany:2004;694.
- Helmuth R. Molecular biological basis for the virulence of *Salmonellae* and the new detection methods resulting from it. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1993;100(7);252-5.
- Helmuth R, Guerra B, Malorny B, Miko A, Schroeter A. Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E. coli*- Isolaten vom Tier, aus Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Dritter Zwischenbericht des Forschungsprojektes vom 11. Februar 2003;2003.
- Hof H, Dörries R, Müller RL. *Mikrobiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2000.
- Holst O, Susskind M, Grimmecke D, Brade L, Brade H. Core structures of enterobacterial lipopolysaccharides. *Prog Clin Biol Res.* 1998;397;23-35.
- Holt PS. Host susceptibility, resistance and immunity to *Salmonella* in animals. In: Wray C und Wray A, (Hrsg.). *Salmonella* in domestic animals. Wallingford: Cabi Publ.; 2000.
- Hoorfar J, Baggesen DL. Importance of pre-enrichment media for isolation of *Salmonella* spp. from swine and poultry. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;169(1);125-30.
- Hsieh HY und Tsen HY. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. *J Food Prot.* 2001;64;1744-50.
- Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment. Proceedings of the 4th international Symposium on the Epidemiology and control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in pork (Salinork). Leipzig, Deutschland:2001;462-4.
- Hurd HS, McKean JD, Griffith RD, Rostagno MH. Estimation of the *Salmonella enterica* prevalence in finishing swine. *Epidemiol Infect.* 2003;132;127-35.

- Jaeger F. Schweineproduktion: Die Salmonellen-Verordnung kommt. Zielsetzung und Stand der Dinge - Beitrag zum gesundheitlichen Verbraucherschutz. *Fleischwirtschaft*.2001;12;15-7.
- Jensen AN, Dalsgaard A, Stockmarr A, Nielsen EM, Baggesen DL. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72;1833-42.
- Jensen AN, Sorensen G, Baggesen DL, Bodker R, Hoorfar J. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. *J Microbiol Methods*. 2003;55(1);249-55.
- Johnston WT, Dewey CE, Friendship RM, Smart N, McEwen BJ, Stalker M et al. An investigation of the etiology of a mild diarrhea observed in a group of grower/finisher pigs. *Can Vet J*. 2001;42;33-7.
- Jorgensen L, Dahl J, Wingstrand A. The effect of feeding pellets, meal and heat treatment on the *Salmonella* prevalence of finishing pigs. Proceedings of the 3rd international Symposium on the Epidemiology and control of Salmonella in pork:Washington, USA;1999.
- Kamphues J, Tabeling R, Stuke O. Interessante diätetische Effekte von Lactulose als Futterzusatzstoff in Schweinefutter. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*. 2003;110;365-8.
- Käsbohrer A, Protz D, Helmuth R, Nockler K, Blaha T, Conraths FJ et al. *Salmonella* in slaughter pigs of German origin: an epidemiological study. *Eur J Epidemiol*. 2000;16(2);141-6.
- Kaufmann F. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für *Salmonella* Bazillen. *Zeitschrift Hyg Infektionskrkh*. 1935;117;26-32.
- Kavanagh KL, Kavanagh NT. A comparison of three ELISA kits for monitoring *Salmonella* antibodies in pig serum or meat juice.Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Deutschland:2004;687.
- Koch FJ. Salmonellen-Monitoring kommt. *dlz-Agrarmagazin*, www.pigpool.de:3;2002
- Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, Graecenitz Av, Isenberg HD et al. Salmonellosen. Zoonosen, Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzte-Verlag; 2004.
- Kristensen M, Lester V, Jürgens 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.
- Lange S, Ehlers J. Salmonellen: Früh auf die Erfordernisse einstellen. Verordnung wird kommen - Nicht alle organisatorischen Konsequenzen sind geklärt. *Fleischwirtschaft*.2002;2;17-8.

- Lehmann J. Zum zeitlichen Ablauf der zur Bildung der Immunglobulin-Klassen beim Schwein. In Dissertation Melanie Peternel 2006: Untersuchungen zur Verwendbarkeit des Immunglobulinklassen differenzierenden Salmonellen-Antikörper Test SALMOTYPE[®] Pig STM-WCE[™] ELISA zur Analyse der Salmonellendynamik in Schweinebeständen. Bakum:2004
- Lehmann J, Roesler U, Lindner T, Kramer T, Gabert J, und Hensel A: Discrimination of vaccinated and infected pigs by *Salmonella*-specific IgA antibodies. Proceedings of the 5th International symposium on the Epidemiology and Control of food borne pathogens in Pork. Heraklion (Griechenland):2003;90-1.
- Lehmann J, Lindner T, Naumann M, Kramer T, Steinbach G, Blaha T, Ehlers J, Selbitz HJ, Gabert J, Roesler U. Application of a novel pig immunoglobulin-isotype-specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium antibodies in serum and meat juice. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society World Congress. Hamburg.2004:Vol.1;388.
- Le Minor L. Genus III. *Salmonella*. In: Krieg, NR und Holt JG (Hrsg.). Bergey's manual of systematic bacteriology. 1. Ausgabe. Williams & Wilkins, Baltimore:1984;427-58.
- Leyk W, Seiffert B. Vergleichende Untersuchungen zur Salmonellenserologie beim Schwein: Probenmaterial, Zeitpunkt der Probenentnahme, Ort der Probenentnahme. AVID Tagung Bakteriologie: Kloster Banz; 2003.
- Ludewig M, Fehlhaber K. Verbreitung von Salmonellen in der Schweinefleischerzeugungskette im Freistaat Sachsen. 2. Serologische Untersuchung von Schlachttierkörpern. Fleischwirtschaft. 2001;7;96-8.
- Matlho G, Himathongkham S, Riemann H, Kass P. Destruction of *Salmonella enteritidis* in poultry feed by combination of heat and propionic acid. Avian Dis. 1997;41:58-61.
- 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.
- Mousing J, Jensen PT, Halgaard C, Bager F, Feld N, Nielsen B et al. Nation-wide *Salmonella enterica* surveillance and control in Danish slaughter swine herds. Prev Vet Med. 1997;29(4);247-61.
- Nicolet J. Salmonellen. Kompendium der Veterinärmedizinischen Bakteriologie. Berlin: Parey Verlag; 1985.
- 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.
- Nielsen B, Baggesen D. Update on laboratory diagnosis of subclinical *Salmonella* infections in pigs. Proceedings of the 2nd international Symposium of the epidemiology and control of Salmonella in pork. Kopenhagen, Dänemark:1997;19-31.

- Nielsen B, Ekeroth L, Bager F, Lind P. Use of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of *Salmonella* infection in slaughter pig herds. J Vet Diagn Invest. 1998;10(2);158-63.
- Nielsen B, Alban L, Stege H, Sorensen LL, Mogelmose V, Bagger J, Dahl J, Baggesen DL. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2001;114(9-10);323-6
- Nollet N, Maes D, Duchateau L, Huysmans K, Geers R, De Kruif A, De Zutter L, Van Hoof J. Riskfactor for the prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. Proceedings of the 5th international Symposium on the Epidemiology and control of foodborne pathogens in pork: Kreta;2003.
- Oliveira CJB, Carvalho LFOS, Garcia TB. Experimental aerogenic transmission of *Salmonella* Agona in weaned pigs. Proceedings of the 18th IPVS Congress. Hamburg, Deutschland;2004;653.
- Olsen A, Aabo S, Nielsen EO, Nielsen BB. Isolation of a *Salmonella*-specific DNA hybridization probe. APMIS.1991;99;114-20.
- Osterberg J, Vagsholm I, Boqvist S, Lewerin SS. Feed-borne outbreak of *Salmonella cubana* in Swedish pig farms: risk factors and factors affecting the restriction period in infected farms. Acta Vet Scand. 2006;47;13-21.
- Perales I, Erkiaga E. Comparison between semisolid Rappaport and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of *Salmonella* spp. from foods and feeds. Int J Food Microbiol. 1991;14(1);51-7.
- Peters T. Salmonellenbekämpfung wird Pflicht. Sonderdruck der top agrar.2002: 3.
- Pietzsch O. Salmonella. In: Blobel H, Schliesser T, (Hrsg.). Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Jena:VEB Fischer Verlag;1981.
- Playfair J. Infection and Immunity. Oxford University Press.1995: Oxford, New York, Tokyo.
- Ploniat, Blickhardt. Salmonelleninfektion und Salmonellose. Lehrbuch der Schweinekrankheiten:Parey;2006.
- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Research in Microbiology. 2004;155(7);568-70.
- Proux K, Cariolet R, Fravallo P, Houdayer C, Keranflech A, Madec F. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. Vet Res. 2001;32(6);591-600.
- 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.

- Rasch G, Schrader C. Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Infektionen nach der Zoonose-RL (92/117/EWG) für 1997. Infektionen mit Zoonoseerregern beim Menschen:1996;5-9.
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J. 1994;8(2);217-25.
- Roesler U, Vonaltrock A, Heller P, Bremerich S, Arnold T, Lehmann J et al. Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2005;52(2);69-74.
- Roesler U. Charakterisierung der Porzinen *Salmonella* Typhimurium DT104 – infektion und Maßnahmen zur Salmonellen-Reduktion in Schweinemast-und Schweinezuchtbetrieben. Leipzig:2006.
- Roitt IM, Brostoff J, Male D. Immunology. Missouri: Mosby;2001.
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD. Bacteriological and serological prevalence in finishing pigs. Proceedings of the 18th IPVS Congress:Hamburg;2004.
- Sander J. Pathogenesis of *Salmonella* infections in humans. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 1993;100(7);283-5.
- 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.
- Schumann C. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. Eur J Nutr. 2002;41(1);I17-I25.
- Schwartz KJ. Salmonellosis. Diseases of Swine. London, Paris: Blackwell Science:1999;535-47.
- Seidler T, Alter T, Kruger M, Fehlhaber K. Transport stress - consequences for bacterial translocation, endogenous contamination and bactericidal activity of serum of slaughter pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2001;114(9-10);375-7.
- Selbitz HJ, Bisping W. Tierseuchen und Zoonosen-Alte und Neue Herausforderungen. Jena, Stuttgart:Gustav Fischer Verlag;1995.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayr A, (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart. Enke Verlag:2006;417-588.
- Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE, Holt PS. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. J.Food Prot. 2004;67;864-69.
- Sibley J, Yue B, Huang F, Harding J, Kingdon J, Chirino-Treje M, Appleyard GD. Comparison of bacterial enriched-broth culture, enzyme linked immunosorbent assay, and broth-culture polymerase chain reaction techniques for identifying asymptomatic infections with *Salmonella* in swine. Can J Vet Res. 2003;67(3);219-24.

- Sorensen LL, Alban L, Nielsen B, Dahl J. The correlation between *Salmonella* serology and isolation of *Salmonella* in Danish pigs at slaughter. *Vet Microbiol.* 2004;101(2);131-41.
- Stege H, Carstensen B, Christensen J, Feld NC, Baggesen DL, Nielsen JP. Subclinical *Salmonella* infection in Danish finishing pig herds: Association between serological and bacteriological testing. Proceedings of the 2nd international Symposium of the epidemiology and control of *Salmonella* in pork. Copenhagen, Dänemark:1997;114-119.
- Steinbach G, Blaha T, Methner U. Estimating the prevalence of *Salmonella* spp. in swine herds - influence of sensitivity and specificity of *Salmonella* detection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002;49(9);438-44.
- Steinbach G, Staak C. Assessment of the *Salmonella* burden in slaughter pigs through the results of meat-juice-ELISA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001;114(5-6);174-8.
- Steinbach G, Methner U, Springer S, Lindner T, Selbitz HJ. The humeral immune response of swine after experimental infection with *Salmonella typhimurium*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2003;116(3-4);124-9.
- Stender H, Sage A, Oliveira K, Broomer AJ, Young B, Coull J. Combination of ATP-bioluminescence and PNA probes allows rapid total counts and identification of specific microorganisms in mixed populations. *J Microbiol Methods.* 2001;46:69-75.
- Stewart DS, Reineke KF, Tortorello ML. Comparison of assurance gold *Salmonella* EIA, BAX for screening/*Salmonella*, and GENE-TRAK *Salmonella* DLP rapid assays for detection of *Salmonella* in alfalfa sprouts and sprout irrigation water. *J AOAC Int.* 2002;85;395-403.
- Swanenburg M, Urlings HA, Snijders JM, Keuzenkamp DA, van KF. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2001;70(3);243-54.
- Taylor WI. Isolation of shigella.I.Xylose lysine agar; new media for isolation of enteric pathogens. *Am J Clin Pathol.* 1965;44;471-5.
- Thorns CJ. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech.* 2000;19(1);226-39.
- Tizard IR. *Veterinary Immunology: an introduction.* 7. Auflage. Auflage. USA:Elsevier; 2004.
- Vassiliadis P, Pateraki E, Papaiconomou N, Papadakis JA, Trichopoulos D. New Procedure of *Salmonella* Enrichment. *Annales de Microbiologie.* 1976;B127(2);195-200.
- Van der Heijden HM. First international ring trial of ELISAs for *Salmonella*-antibody detection in swine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001;114(9-10);389-92.
- Van der Wolf PJ, Elbers AR, van der Heijden HM, van Schie FW, Hunneman WA, Tielen MJ. *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in The Netherlands. *Vet Microbiol.* 2001;80(2);171-84.
- 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(3);127-34.

-
- Voogt N, Nagelkerke NJ, van de Giessen AW, Henken AM. Differences between reference laboratories of the European community in their ability to detect *Salmonella* species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21(6):449-54.
- Waltman WD, Mallinson ET. Isolation of *Salmonella* from poultry tissue and environmental samples: a nationwide survey. Avian Dis. 1995;39(1):45-54.
- Wegener HC, Baggesen DL. Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *Infantis* by use of pulsed field gel electrophoresis. Int J Food Microbiol. 1996;32(1-2):125-31.
- Westphal O, Jann K, Himmelspach K. Chemistry and immunochemistry of bacterial lipopolysaccharides as cell wall antigens and endotoxins. Prog Allergy. 1983;33:29-39.
- Wiberg C, Norberg P. Comparison between a cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth and motility enrichments on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection from food and feed. Int J Food Microbiol. 1996;29(2-3):353-60.
- 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.
- Zastrow KD, Schoneberg I. Outbreaks of food-borne infections and microbe-induced poisonings in West Germany 1991. Gesundheitswesen. 1993;55(5):250-3.

DANKSAGUNG

Die Bearbeitungszeit meiner Dissertation war von vielen persönlichen und beruflichen Umbrüchen begleitet. Jedoch erhielt ich jederzeit Unterstützung von mir lieben Menschen und dafür kann ich nicht oft genug Danke sagen.

Ich möchte mich bei Herr Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas bedanken und ebenso für die zur Verfügung gestellten Mittel zur Durchführung der Versuche im Stall und im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler für die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und geduldige Beantwortung der Fragen, sei es im Labor, im Tierversuchsstall oder während der Auswertung der Ergebnisse. Vor allem danke ich jedoch für den nötigen Druck und die Hilfestellungen in der Schlussphase der Dissertation.

Vielen Dank auch an Eveline Brumme und Nadja Leinecker für die Einarbeitung und Hilfestellung im Labor bei bakteriologischen und serologischen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig möchte ich für die schöne Zeit im Institut danken, wobei mein großer Dank vor allem Martin Leffler und Michael Stief gilt, welche mir im Tierversuchsstall „unabkömmlich“ waren.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Elvira und Frank Matthies, für die immer währende Unterstützung schon während des Studiums und den unerschütterlichen Glauben an mich. Auch dem Rest meiner Familie danke ich für liebe Worte und Geborgenheit.

Meinen Freunden danke ich für die Motivation, das akribische Korrekturlesen und die Geduld mit mir in der Schlussphase der Dissertation, besonders jedoch Mike, der mir bei den letzten „Zügen“ für die Veröffentlichung geholfen hat. Meiner Freundin Claudia Schulz danke ich für lange aufmunternde Telefongespräche in Phasen der Panik und das aufmunternde Zureden zum „Durchhalten“.