

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung und Ziele der Arbeit	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 <i>Salmonella</i> spp.	3
2.1.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie	3
2.1.1.1 <i>Salmonella</i> Saintpaul	4
2.1.2 Isolierung	5
2.1.3 Identifizierung und Differenzierung	6
2.1.3.1 Identifizierung	6
2.1.3.1.1 Biochemische Methoden	6
2.1.3.1.2 Serotypisierung	7
2.1.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis	8
2.1.3.2 Stammdifferenzierung	8
2.1.3.2.1 Plasmidanalyse	8
2.1.3.2.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	9
2.1.3.2.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)	9
2.1.4 Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung	10
2.1.4.1 Salmonellose des Menschen	10
2.1.4.2 Infektionswege des Menschen	11
2.1.4.3 <i>Salmonella</i> spp. beim Wirtschaftsgeflügel	11
2.1.4.4 Prävalenz	11
2.1.4.5 Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels	13
2.1.4.6 Gesetzliche Bestimmungen	13
2.1.4.7 Maßnahmen zur Bekämpfung	14
2.2 <i>Campylobacter</i> spp.	16
2.2.1 Allgemeine Charakteristika und Taxonomie	16
2.2.2 Isolierung	17
2.2.2.1 Anreicherungsmedien (flüssig)	18
2.2.2.2 Selektivmedien (fest)	19
2.2.3 Identifizierung und Differenzierung	19
2.2.3.1 Identifizierung	19
2.2.3.1.1 Biochemische Methoden	19
2.2.3.1.2 Serotypisierung	20
2.2.3.1.3 Molekularbiologischer Nachweis	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.2	Stammdifferenzierung.....	21
2.2.3.2.1	Multi Locus Sequence Typing.....	22
2.2.3.2.2	Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes	22
2.2.4	Gesundheitliche/ökonomische Bedeutung.....	23
2.2.4.1	Campylobacteriose des Menschen.....	23
2.2.4.2	Infektionswege.....	24
2.2.4.3	<i>Campylobacter</i> spp. beim Wirtschaftsgeflügel	25
2.2.4.4	Prävalenz	26
2.2.4.5	Infektionswege des Wirtschaftsgeflügels	27
2.2.4.6	Kolonisation	28
2.2.4.7	Gesetzliche Bestimmungen	28
2.2.4.8	Maßnahmen zur Bekämpfung	29
3.	Eigene Untersuchungen	31
3.1	Material	31
3.1.1	Arbeitsmaterial zur Probennahme.....	31
3.1.2	Arbeitsmaterial zur Probenaufbereitung.....	31
3.1.3	Arbeitsmaterial für PFGE	31
3.1.4	Arbeitsgeräte für Multiplex-PCR, qPCR und <i>FlaA</i> -SVR.....	32
3.2	Medien	33
3.2.1	Peptonwasser.....	33
3.2.2	Modified semisolid Rappaport-Vasiliadis (MSRV)-Agar.....	33
3.2.3	Rambach Agar.....	33
3.2.4	Preston Bouillon	33
3.2.5	Karmali Agar.....	34
3.2.6	Columbia Agar.....	34
3.2.7	Nähragar.....	34
3.3	Reagenzien und Chemikalien	35
3.3.1	Für die DNA-Extraktion.....	35
3.3.1.1	TE-Puffer 1:10	35
3.3.1.2	Chelex-Lösung 5%	35
3.3.1.3	Qia-Amp QIAamp®DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)	35
3.3.2	Für die Multiplex-PCR nach Wang et al., 2002	36
3.3.2.1	Qiagen Multiplex-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden):.....	36
3.3.2.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	36
3.3.2.3	1,5% Agarosegel.....	36
3.3.2.4	Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer	37

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Für die quantitative multiplex Realtime PCR nach He et. al (2010).....	37
3.3.3.1	Qiagen QuantiTect Multiplex PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden).....	37
3.3.3.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	38
3.3.4	Für die Sequentierung des Flagellin-A Genes nach Meinersmann et al. (1997).....	38
3.3.4.1	PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)	38
3.3.4.2	Primer (biomers.net GmbH, Ulm).....	38
3.3.4.3	MinElute Gel Extraction Kit für die Extraktion der DNA.....	39
3.3.4.4	1 % Agarosegel.....	39
3.3.5	Für die PFGE	39
3.3.5.1	Tris-EDTA (TE)-Puffer.....	39
3.3.5.2	Zellsuspensionspuffer CSB.....	39
3.3.5.3	Zellysispuffer CLB.....	40
3.3.5.4	Restriktionspuffer	40
3.3.5.5	TBE-Laufpuffer.....	40
3.3.5.6	Agarosegel.....	41
3.3.5.7	Ethidiumbromid-Färbelösung	41
3.4	Methoden	41
3.4.1	<i>Salmonella</i>	41
3.4.1.1	Probennahme <i>Salmonella</i>	41
3.4.1.2	Serovarbestimmung und Resistenzverhalten von <i>S. Saintpaul</i> nach Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)	42
3.4.1.3	Kontrollstamm.....	42
3.4.1.4	Einbetten der Zellen in Agarosegelblöckchen.....	42
3.4.1.5	Lyse der Zellen im Agarosegelblöckchen	43
3.4.1.6	Waschen der Agarosegelblöckchen	43
3.4.1.7	Restriktion der DNA mittels XbaI.....	43
3.4.1.8	Beladen des Gels für die PFGE	43
3.4.1.9	Laufbedingungen für PFGE.....	44
3.4.1.10	Färben des Gels.....	44
3.4.1.11	Auswertung mittels Bionumerics	44
3.4.2	<i>Campylobacter</i>	44
3.4.2.1	Probennahme <i>Campylobacter</i> aus Salmonellenvoranreicherung.....	44
3.4.2.2	Probennahme <i>Campylobacter</i> von einer positiven Putenherde.....	45
3.4.2.3	Bestimmung der Menge der im Kot enthaltenen <i>Campylobacter</i> durch Erstellung einer Verdünnungsreihe.....	45
3.4.2.4	Beimpfung von Sockentupfern.....	45
3.4.2.5	Aufbewahrung der Sockentupfer.....	46

Inhaltsverzeichnis

3.4.2.6	Kultivierung und Isolierung	46
3.4.2.7	Identifizierung verdächtiger Kulturen mittels Multiplex PCR	46
3.4.2.8	Kontrollstämme.....	46
3.4.2.9	<i>Campylobacter</i> DNA-Präparation mittels Chelex.....	47
3.4.2.10	Extrahieren der DNA aus Rückstellproben	47
3.4.2.11	Untersuchung von Rückstellproben auf das Vorkommen von <i>Campylobacter</i> -DNA mittels Multiplex qPCR nach He et al.....	47
3.4.2.12	Bestimmung der Ausscheidung von <i>Campylobacter</i> spp. bei Puten aus Hobbyhaltung.....	47
3.4.2.13	Aufbewahrung der Sockentupfer, Teil 1	48
3.4.2.14	Aufbewahrung der Sockentupfer, Teil 2	48
3.4.2.15	Differenzierung ausgewählter Isolate mittels <i>flaA</i> -SVR- Sequenzierung	49
3.4.2.16	Gelextraktion.....	49
3.4.2.17	Überprüfung der Gelextraktion mittels Gelelektrophorese	50
3.4.2.18	Sequenzierung	50
3.4.2.19	Auswertung der Sequenzierungsergebnisse	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Ergebnisse <i>Salmonella</i>	51
4.1.1	Untersuchung von Feldproben auf <i>Salmonella</i> spp. im Institut für Geflügelkrankheiten	51
4.1.1.1	Jahr 2008	51
4.1.1.2	Jahr 2009	52
4.1.1.3	Jahr 2010	53
4.1.1.4	Jahr 2011	55
4.1.2	Entwicklung der Isolierungsergebnisse der wichtigsten eingesandten <i>Salmonellen</i> proben	56
4.1.3	Vorkommen <i>S. Saintpaul</i>	57
4.1.4	Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Antibiotika der isolierten <i>Salmonella</i> Saintpaul.....	58
4.1.5	Etablierung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	60
4.1.6	Genotypisierung der <i>S. Saintpaul</i> -Isolate mittels Bionumerics	62
4.1.7	Erstellung von Bandenprofilen	67
4.1.8	Einbeziehung von Bandenprofilen und Resistenzprofilen in die Auswertung	68
4.1.9	Zusammenfassende Ergebnisse der Auswertungsmethoden zur Differenzierung von <i>S. Saintpaul</i>	69
4.2	Ergebnisse <i>Campylobacter</i>	69
4.2.1	Etablierung der Multiplex PCR von <i>Campylobacter</i> spp. nach Wang et al. (2002).....	69

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Isolierung von <i>Campylobacter</i> spp. aus der Salmonellenvoranreicherung	71
4.2.3	Untersuchung von 70 Proben nach zwölfstündiger aerober Bebrütung.....	74
4.2.4	Etablierung der Multiplex qPCR nach He et al. (2010).....	74
4.2.5	Ergebnisse der Untersuchung von Rückstellproben.....	78
4.2.6	Ergebnisse Probennahme <i>Campylobacter</i> spp. von einer positiven Putenherde, Lagerungsversuch 1:	79
4.2.6.1	Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 1:	82
4.2.7	Experimentelle Kontamination von Sockentupfern, Lagerungsversuch 2:	83
4.2.7.1	Ergebnisse der qPCR des Lagerungsversuches 2:	84
4.2.8	Typisierung von <i>C. jejuni</i> mittels Sequenzierung des <i>flaA</i> -Genes	84
5.	Diskussion	91
5.1	Salmonellen	91
5.1.1	Salmonellen Vorkommen	91
5.1.2	<i>Salmonella</i> Saintpaul Vorkommen - Vergleichend	93
5.1.2.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und manuelle Auswertung der Bandenprofile.....	95
5.1.3	Bewertung des <i>S. Saintpaul</i> -Dendrogramms	95
5.2	<i>Campylobacter</i>	97
5.2.1	<i>Campylobacter</i> spp.....	97
5.2.2	Isolierung.....	97
5.2.3	Nachweis mittels Multiplex qPCR.....	100
5.2.4	Saisonalität der untersuchten <i>Campylobacter</i> -Infektionen.....	101
5.2.5	Aufbewahrungsversuche.....	101
5.2.6	Untersuchung der Rückstellproben	104
5.2.7	Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse.....	105
5.2.8	Ergebnisse der Sequenzierung der Short Variable Region des Flagellin-A-Genes (<i>flaA</i> -SVR)	105
5.3	Zusammenhang zwischen Salmonellen- und <i>Campylobacter</i>infektionen bei Geflügel	107
5.4	Fazit	107
6.	Zusammenfassung	109
7.	Summary	112
8.	Literaturverzeichnis	114
Anhang	147