

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen,

Veterinärmedizinische Universität Wien

Klinik für Geflügel und Fische

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael Hess)

Re-Isolierung von *Salmonella* Infantis in einem Versuchsmodell

Diplomarbeit

zur Erlangung des Titels

MAGISTER MEDICINAE VETERINARIAE

Der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von

Mohammad Deyaa Al Masri

Wien, April 2022

Betreuer:

Dr. med. vet. Dipl. ECPVS Claudia Hess

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen,

Klinik für Geflügel und Fische

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

Priv.Doz. Dr. Joachim Spargser

Institut für Mikrobiologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen der Geflügelklinik der VetmedUni Wien bedanken, die mich während meines Praktikums begleitet und während der Anfertigung meiner Diplomarbeit mit viel Engagement unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle gebührt mein aufrichtiger Dank Frau Dr. med. vet Claudia Hess, die meine Diplomarbeit mit ihren wertvollen Anregungen und konstruktiven Anmerkungen betreut und begutachtet hat. Ihre fachliche Unterstützung, Ihre Geduld und Ihre Hilfsbereitschaft hat wesentlich zum Gelingen meiner Diplomarbeit beigetragen.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Univ. Prof. Dr. med. vet Michael Hess, der einen maßgeblichen Anteil daran hat, dass ich mich für dieses Themengebiet entschieden habe.

Danken möchte ich außerdem meinem Vater, der mich trotz seiner langjährigen Abwesenheit als einzigartiges Vorbild mein ganzes Leben lang motiviert und begleitet und meiner Mutter, die mich auch aus der Ferne liebevoll zur Seite steht.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Literaturübersicht.....	2
2.1.	Allgemeines, Taxonomie	2
2.2.	Wirtsspezifische Salmonellen.....	2
2.3.	Nicht-wirtsspezifische Salmonellen	3
2.3.1.	Bedeutung von <i>Salmonella</i> Infantis	3
2.3.2.	Nachweis von <i>Salmonella</i> Infantis	4
2.3.3.	Bekämpfung und Prophylaxe bei <i>Salmonella</i> Infantis	4
3.	Material und Methode	5
3.1.	<i>Salmonella</i> Infantis Isolat	5
3.2.	Tierversuch und Probennahme	5
3.3.	Aufarbeitung der Kloakentupferproben	6
3.3.1.	Direktausstrich.....	6
3.3.2.	Anreicherungsverfahren.....	7
3.4.	Beurteilung der Ausscheidungsrate (Shedding)	8
3.5.	Datenanalyse	8
4.	Ergebnisse.....	9
4.1.	Wachstumsbeurteilung von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1.	9
4.2.	Wachstumsbeurteilung von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 2	10
4.3.	Ausscheidungsrate (Shedding) von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1.....	12
4.4.	Ausscheidungsrate (Shedding) von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 2.....	13
4.5.	Wachstumsbeurteilung und Ausscheidungsrate (Shedding) von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 3	14
4.6.	Vergleich der Wachstumsbeurteilung und Ausscheidungsrate (Shedding) von <i>Salmonella</i> Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1 und Gruppe 2	14
5.	Diskussion.....	15
6.	Zusammenfassung / Summary	17
7.	Literatur	18
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	21

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Lebensmittelbedingte Infektionen mit Salmonellen zählen zu den weltweit häufigsten Ursachen humaner Erkrankungen. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* umfasst mehr als 1400 nicht-typhoide Serotypen, von denen allerdings nur eine geringe Anzahl für den Großteil der beim Geflügel vorkommenden Isolate verantwortlich ist, insbesondere *Salmonella* (*S.*) Enteritidis, *S.* Typhimurium und *S.* Infantis (EFSA, 2021). Als Reservoir für eine *S.* Infantis Salmonellose beim Menschen werden primär tierische Lebensmittel, hier vorrangig Geflügelfleisch, angesehen. *S.* Infantis ist mittlerweile in der EU das am häufigsten vorkommende Serovar in Mastgeflügelbeständen sowie im Geflügelfleisch (EFSA, 2021). Im Feld wird eine Eradikation von *S.* Infantis in betroffenen Geflügelmastbetrieben als äußerst schwierig angesehen. Trotz stringenter Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zwischen den Mastdurchgängen werden immer wiederkehrende Infektionen festgestellt. Es konnte in vorhergehenden Studien gezeigt werden, dass *S.* Infantis sich im Vergleich zu anderen Serovaren als sehr säuretolerant erwies, und auch bei niedrigen Temperaturen einen Biofilm ausbilden kann (Moraes et al., 2018). Zusätzlich wiesen *S.* Infantis Isolate eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmittel auf (Drauch et al., 2020). Ein weiterer interessanter Fakt ist die Tatsache, dass sich *S.* Infantis Isolate in ihrem Phänotyp wie auch Genotyp unterscheiden. Hier spielt das pESI-like Plasmid eine große Rolle, welches auch als entscheidend für das Virulenzverhalten im Tier gezeigt wurde (Drauch et al., 2021). Eine Keimreduktion im Tier wäre ein Ansatz, um die Anzahl an Humaninfektionen zu reduzieren. Hierzu sind allerdings Kenntnisse um das Ausscheidungsverhalten von *S.* Infantis von Bedeutung. Zu diesem Zwecke wurde in der vorliegenden Arbeit die Ausscheidungsrate von *S.* Infantis bestimmt, unter der Berücksichtigung, ob der Infektionszeitpunkt eine Rolle hierbei spielt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Allgemeines, Taxonomie

Salmonellen gehören zu der Familie der Enterobacteriaceae (Tabelle 1). Es handelt sich um Gramnegative Stäbchen. Die Gattung Salmonellen umfasst 2 Spezies: *S. enterica* und *S. bongori*. Die Subspezies *S. enterica ssp. enterica* umfasst die wirtsspezifischen und nicht-wirtsspezifischen Salmonellen beim Geflügel.

Tabelle 1: Systematik der Salmonellen

Domäne	Bakterien
Stamm	Proteobacteria
Klasse	Gammaproteobacteria
Ordnung	Enterobacterales
Familie	Enterobacteriaceae
Gattung	Salmonellen

2.2. Wirtsspezifische Salmonellen

Salmonella Gallinarum Biovar Gallinarum und *Salmonella* Gallinarum Biovar Pullorum sind wirtsspezifische Salmonellen, die zu Erkrankungen des Geflügels führen und große wirtschaftliche Bedeutung haben. Neben Hühnern, sind auch Truthähne, Perlhühner, Wachteln, Fasane, Sperlinge und Papageien anfällig. Während die Anfälligkeit bei Enten, Gänsen und Tauben variiert sind die meisten anderen Vögel resistent (Gast und Porter, 2020).

Salmonella Gallinarum Biovar Gallinarum ist der primäre Erreger des Geflügeltyphus, welcher von einer hohen Morbiditäts- und Sterberate bei erwachsenen Vögeln geprägt ist und zu schwerer Sepsis führen kann. Die durch *Salmonella* Gallinarum Biovar Pullorum verursachte Pullorum-Krankheit ist eine verheerende systemische Erkrankung beim Jungvogel, die mit einer hohen Sterblichkeitsrate einhergeht (Barrow and Freitas Neto, 2011).

Es gibt allerdings auch Vögel, welche sich von der Pullorum-Krankheit erholen und/oder keine klinischen Anzeichen der Krankheit zeigen. Die meisten Tiere werden zum Krankheitsträger und es besteht die Chance der vertikalen Übertragung (Berchieri et al., 2001)

2.3. Nicht-wirtsspezifische Salmonellen

Salmonella enterica subspecies *enterica* umfasst mehr als 1400 nicht-typhoide Serotypen, von denen allerdings nur eine geringe Anzahl für den Großteil der beim Geflügel vorkommenden Isolate verantwortlich ist, insbesondere *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Infantis. Als Erreger lebensmittelbedingter Infektionen zählen diese Salmonellen zu den weltweit häufigsten Ursachen humaner Erkrankungen. Geflügelfleisch gilt hierfür als eine der wichtigsten Ansteckungsquellen (EFSA, 2021).

2.3.1. Bedeutung von *Salmonella* Infantis

S. Infantis ist mittlerweile in der EU das am häufigsten vorkommende Serovar in Mastgeflügelbeständen sowie im Geflügelfleisch (EFSA, 2021; Abbildung 1). Aktuell sind 36.3% der Isolate von Masthühnern und 49.1% der Isolate von Hühnerfleisch dem Serovar Infantis zuzuordnen. Bei Humanisolaten nimmt dieses Serovar mittlerweile den vierten Rang ein. Durch das Auftreten von *S. Infantis* Isolaten, die das pESI-like Plasmid in sich tragen wird diesem Serovar auch künftig große Bedeutung beigemessen, da dieses Plasmid nicht nur in der Vermittlung von Antibiotikaresistenzen eine Rolle spielt, sondern auch Virulenzgene in sich trägt.

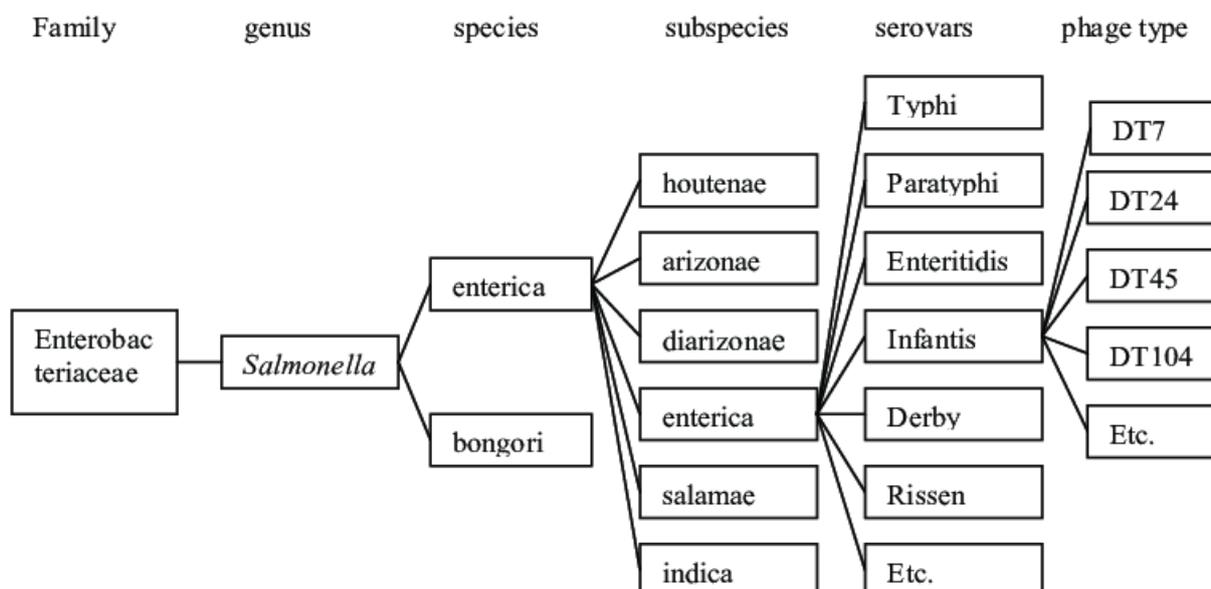


Abbildung 1. Taxonomie der Salmonelle

2.3.2. Nachweis von *Salmonella* Infantis

Der Nachweis von Salmonellen erfolgt basierend auf gesetzliche Vorgaben. Hier kommt in Österreich die Geflügelhygieneverordnung 2007 zur Anwendung. Die Isolierung von Salmonellen im Geflügelbereich basiert auf der Norm ISO 6579.

2.3.3. Bekämpfung und Prophylaxe bei *Salmonella* Infantis

Allgemeine Hygienemaßnahmen sind bei der Vorbeugung einer *S. Infantis* Infektion beim Geflügel zentral. Es ist bekannt, dass *S. Infantis* durch unbelebte Vektoren wie z.B Futter, Staub, übertragen werden kann (Prunic et al., 2016; Ortali, 2019; Pless, 2019). Die Österreichische Qualitätsgeflügelvereinigung (QGV) erstellt diesbezüglich in regelmässigen Abständen Programme. Hierin sind insbesondere die optimale Reinigung und Desinfektion von Bedeutung, um die Keimbelastung gering zu halten. Der gesamte Stall inklusive Tränken und Futtermittelbehälter sollte sachgemäß und regelmäßig gereinigt und desinfiziert werden. Drauch et al. (2020) konnten allerdings zeigen, dass das *S. Infantis* Isolat selbst die Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels beeinflussen kann. Deshalb ist es ratsam bei Problembetrieben vor der Neueinstellung bakteriologische Kontrollen durchzuführen. Kürzlich wurde auch der Einsatz von Bakteriophagen berichtet, der zu einer Verringerung der *S. Infantis* Belastung in Stallungen führen kann (Sevilla-Navarro et al., 2020).

Ein weiterer wichtiger Teil der Biosecurity sind die Verwendung von stalleigener Kleidung und –eigenen Schuhen, das Vorhandensein einer Hygieneschleuse sowie die Lagerung von Kadavern in entsprechender Entfernung zu den Stallgebäuden. Schadnager und Insekten sind bekannt für die Übertragung von *S. Infantis*, deshalb ist ein besonderes Augenmerk auch auf dessen Bekämpfung zu legen (Hald et al., 1998; Olsen und Hammack, 2000; Lapuz et al., 2012).

Eine gezielte Möglichkeit der Prophylaxe ist der Einsatz von Impfstoffen. Durch die Verwendung von heterologen Salmonellenimpfstoffen basierend auf *S. Typhimurium* konnte beim Legehuhn eine Reduktion von *S. Infantis* in der Ausscheidungsrate sowie eine reduzierte Besiedlung innerer Organen gezeigt werden (Eckhaut et al., 2018). Seit Kurzem ist auch ein inaktivierter 3-fach Impfstoff für Elterntiere am Markt, der neben *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* auch *S. Infantis* enthält. Mit diesem Impfstoff wurde eine Reduktion der Gesamtzahl *S. Infantis* positiver Tiere sowie eine reduzierte Besiedlung innerer Organe gezeigt (Crouch et al., 2020).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. *Salmonella* Infantis Isolat

Für die vorliegende Studie wurde das *S. Infantis* Isolat MRS16/01939 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Isolat, welches das pESI-like Plasmid in sich trägt. Für die vorliegende Studie erfolgte die Anzucht dieses Stammes in Lenox L-Broth Medium (LB Broth, Invitrogen, Germany) bei 37°C in einer aeroben Schüttelkultur (200 rpm) für 24 h. Die Infektionsdosis des Isolates betrug 10⁸ CFU/ml.

3.2. Tierversuch und Probennahme

Die Studie umfasste 35 SPF Tiere (VALO Biomedica, Germany), deren Bebrütung und Schlupf an der Klinik für Geflügel und Fische stattfand. Die Tiere wurden in 3 Gruppen aufgeteilt und in Isolatoren (Montair HM1500, The Netherlands) gehalten. Jedes Tier wurde individuell markiert (Swiftack™, Heartland Animal Health, Inc., USA). Futter und Wasser wurde *ad libitum* angeboten. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 7 bzw. 8 Wochen gehalten. Die Tiere der ersten Gruppe wurden am 1 LT mit 0.5 ml *S. Infantis* oral infiziert, die Tiere der Gruppe 2 am 28. LT. Die Tiere der Gruppe 3 dienten als Negativkontrollgruppe und erhielten an den Infektionstagen jeweils 0,5 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, GIBCO, Österreich).

Die Studie wurde genehmigt unter der Geschäftszahl (GZ 2020-0.220.213).

Tabelle 2: Angaben zu den Gruppen (LT = Lebenstag)

Gruppen	Anzahl der Tiere	Infektion	Beprobungszeitpunkt (Alter der Tiere in Tagen)
1	13	1. LT	8, 15, 22, 29, 36, 43
2	14	28. LT	40, 43, 50
3	8	Nein	8, 15, 22, 29, 36, 40, 43, 50

Das Ausscheidungsverhalten (Shedding) des *S. Infantis* Stammes MRS16/01939 wurde mittels Untersuchung von Kloakentupfern analysiert. Die Probennahme erfolgte bei den Tieren der Gruppe 1 wöchentlich (beginnend mit 7 Tage nach der Infektion), und es wurden stets Kloakentupfer von allen Tieren untersucht. Bei den Tieren der Gruppe 2 fanden 3

Probennahmen statt: 12, 15 und 22 Tage nach der Infektion. An den ersten beiden Zeitpunkten wurden jeweils 10 Tiere, am letzten Zeitpunkt 5 Tiere beprobt. Eine Beprobung der Tiere der Negativkontrolle erfolgte zu allen Zeitpunkten der Probennahmen.

Alle Kloakentupfer wurden im Duplikat genommen.

3.3. Aufarbeitung der Kloakentupferproben

Die im Duplikat gewonnenen Kloakentupferproben wurden mittels Direktausstrich auf XLD Agar gebracht und im Falle eines negativen Ergebnisses wurde der zweite Kloakentupfer, der zwischenzeitlich bei +4°C für 24 h gelagert wurde, mittels Anreicherungsverfahrens untersucht.

3.3.1. Direktausstrich

Die Kultivierung der Kloakentupfer erfolgte mittels Drei-Ösenausstriches auf Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD, Merck, Österreich). Die Kulturen wurden für 24-h bei 37°C bebrütet. Die Auswertung des Wachstums erfolgte durch eine Einteilung in folgende Grade: geringgradig, Wachstum nur der erste Ausstrich; mittelgradig, Wachstum am ersten und zweiten Ausstrich; hochgradig, Wachstum am ersten, zweiten und dritten Ausstrich (Abbildung 2).

geringgradig (ggr): Wenn die Kolonien nur auf dem ersten Teilausstrich wachsen.



mittelgradig (mgr): Wenn die Kolonien auf dem ersten Teilausstrich und dem zweiten Verdünnungsausstrich wachsen.



hochgradig (hgr): Wenn die Kolonien auf dem ersten Teilausstrich sowie auf den zweiten und dritten Verdünnungsausstrichen wachsen.



Abbildung 2: Darstellung der Beurteilung des Wachstumsgrades von *S. Infantis* bei Direktausstrichen.

3.3.2. Anreicherungsverfahren

Konnte *S. Infantis* nicht von den Kloakentupfern mittels Direktausstrich nachgewiesen werden, wurde das Anreicherungsverfahren mit dem zweiten Tupfer durchgeführt. Dies erfolgte entsprechend der ISO 6579-1:2017. Hierfür wurde jeder Kloakentupfer, der sich im Direktausstrich als negativ erwies in 225 ml gepufferten Peptonwasser (BPW) bei 37°C für 24 h, aerob bebrütet. Anschliessend erfolgte das Aufbringen von 3 Tropfen dieser Anreicherung auf modifizierten semi-soliden Rappaport Vassiliadis Agar supplementiert mit Novobiocin (MSRV). Die Bebrütung erfolgte bei 41.5°C, aerob für 24-48 h (Abbildung 3). Bei Auftreten eines Schwärmverhaltens wurde mittels Einmalöse (1 µl, VWR, Österreich) eine Probe entnommen und auf Xylose Lactose Desoxycholat (XLD) Agar ausgestrichen. Bei Wachstum von für Salmonellen charakteristischen schwarzen Kolonien auf diesem Nährboden erfolgte zur Überprüfung eine Agglutination von 5 unterschiedlichen Kolonien mittels *Salmonella* C gruppenspezifischen Serovar (SIFIN, Germany).

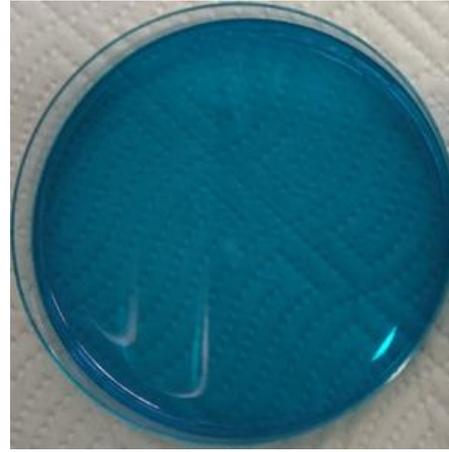


Abbildung 3: Wachstumsverhalten von S. Infantis MSR 16/01939 auf MSR V Agar (links) und einer Negativkontrolle (rechts) im Vergleich nach 24h Bebrütung.

3.4. Beurteilung der Ausscheidungsrate (Shedding)

Die Ausscheidungsrate der Tiere basierend auf der Re-Isolierung des S. Infantis Isolates MRS16/01939 von Kloakentupfern wurde wie folgt beurteilt:

- 1) negativ: kein Wachstum im Direktausstrich und in der Anreicherung
- 2) niedrige Ausscheidungsrate: Wachstum nur in Anreicherung „low shedders“
- 3) hohe Ausscheidungsrate – Wachstum im Direktausstrich „high shedders“

3.5. Datenanalyse

Alle Daten wurden mittels Microsoft Excel 2016 analysiert und dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Wachstumsbeurteilung von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1

Bei den unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten über den gesamten Beobachtungszeitraum (6 Wochen) konnten einige Unterschiede festgestellt werden. In der ersten Beprobungswoche konnte bei dem Großteil der Kloakentupfer (9/13) ein mittelgradiges Wachstum festgestellt werden. Ein hochgradiges Wachstum trat verzögert auf, und wurde erstmalig bei einer Probe 3 Wochen nach der Infektion festgestellt; danach bei 2 und 3 Proben jeweils 5 und 6 Wochen nach der Infektion. Beim 1 Beprobungszeitpunkt konnten bei 1 Tier keine Salmonellen von den Kloakentupfern isoliert werden; beim 4 und 5 Beprobungszeitpunkt bei jeweils 2 Tieren (Abbildung 4).

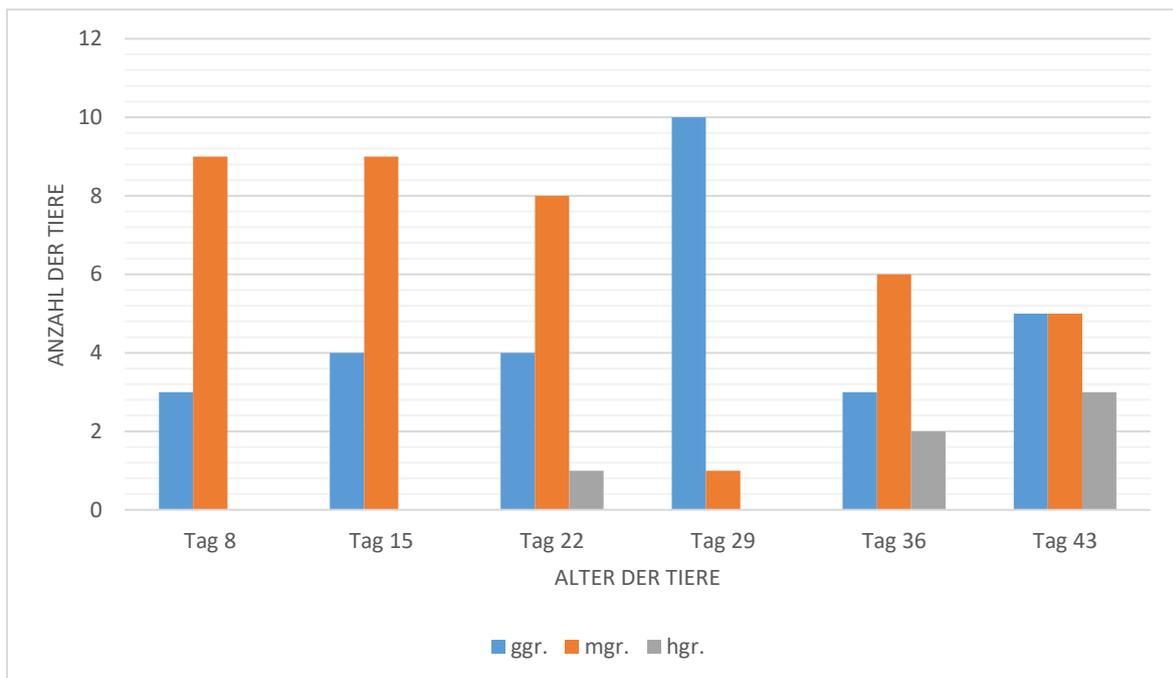


Abbildung 4: Darstellung der Wachstumsbeurteilung von *S. Infantis* anhand der Kloakentupfer der Gruppe 1 über den gesamten Untersuchungszeitraum (ggr.=geringgradiges Wachstum; mgr.=mittelgradiges Wachstum; hgr.=hochgradiges Wachstum)

Über den Untersuchungszeitpunkt gesehen, erwies sich das Wachstum zum Großteil als gering- bis mittelgradig, mit 52% und 40% der untersuchten Kloakentupfer. Ein hochgradiges Wachstum konnte bei nur 8% der Proben nachgewiesen werden (Abbildung 5).

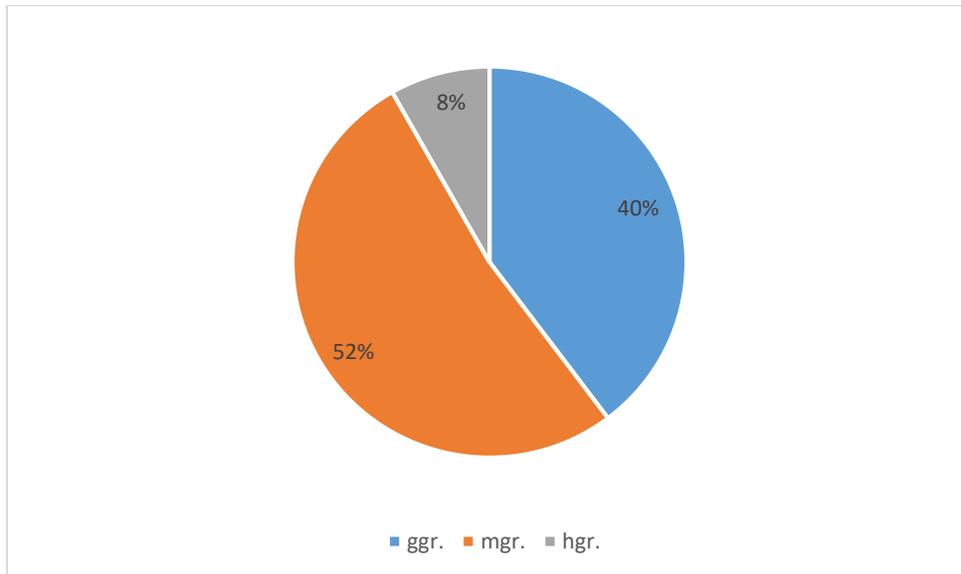


Abbildung 5: Prozentuelle Verteilung des Wachstums von *S. Infantis* anhand des Direktausstriches der Kloakentupfer der Gruppe 1 über den gesamten Untersuchungszeitraum (ggr.=geringgradiges Wachstum; mgr.=mittelgradiges Wachstum; hgr.=hochgradiges Wachstum)

4.2. Wachstumsbeurteilung von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 2

Zur ersten Beprobungswoche konnte bei dem Großteil der Kloakentupfer (6/10) ein geringgradiges Wachstum festgestellt werden. Bei der zweiten und dritten Untersuchung konnte in etwa gleich vielen Kloakentupfern ein gering- und ein mittelgradiges Wachstum nachgewiesen werden (Abbildung 6). Ein hochgradiges Wachstums konnte bei keinem Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden.

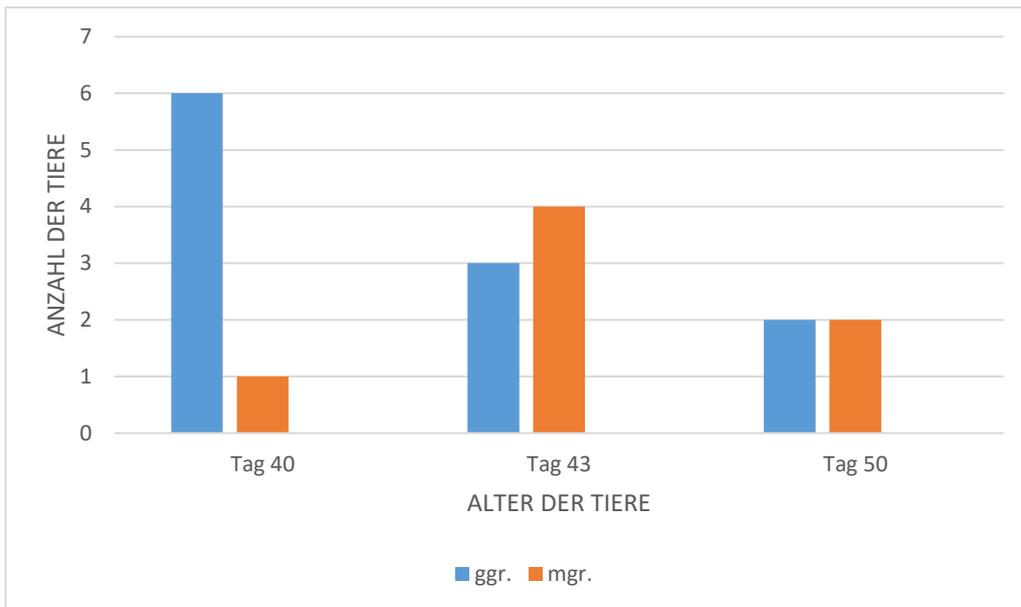


Abbildung 6: Darstellung der Wachstumsbeurteilung von *S. Infantis* anhand der Kloakentupfer der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum (ggr.=geringgradiges Wachstum; mgr.=mittelgradiges Wachstum)

Über den Untersuchungszeitpunkt gesehen, erwies sich das Wachstum zum Großteil als geringgradig, mit 61% der untersuchten Kloakentupfer (Abbildung 7).

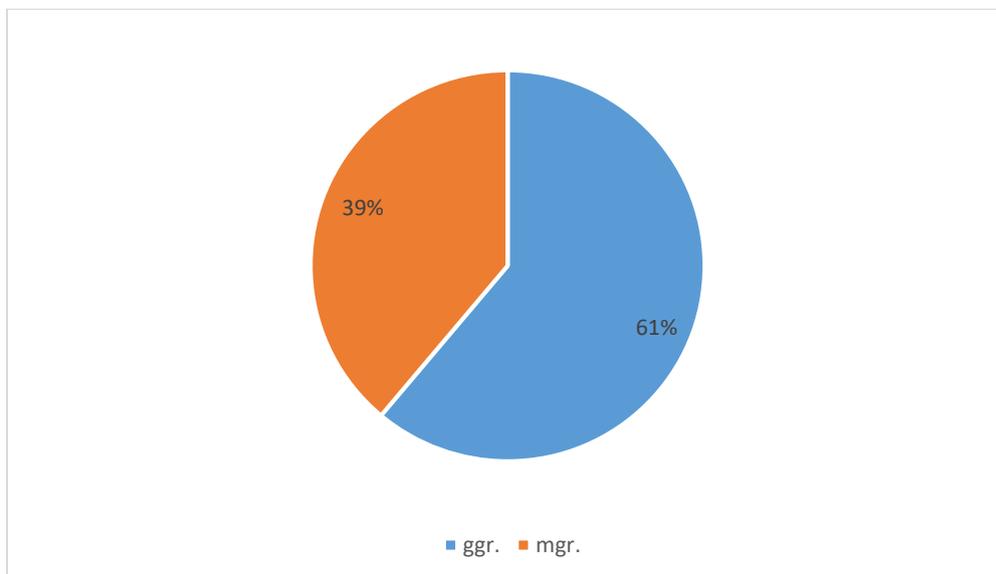


Abbildung 7: Prozentuelle Verteilung des Wachstums von *S. Infantis* anhand des Direktausstriches der Kloakentupfer der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum (ggr.=geringgradiges Wachstum; mgr.=mittelgradiges Wachstum)

4.3. Ausscheidungsrate (Shedding) von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1

Alle Tiere schieden *S. Infantis* über den gesamten Untersuchungszeitraum aus, und der Großteil der Tiere zeigte eine hohe Ausscheidungsrate. Nur vereinzelt wurden Tiere mit einer niedrigen Ausscheidungsrate gefunden: 1 Tier 1 Woche nach Infektion, 2 Tiere je 4 und 5 Wochen nach Infektion (Abbildung 8).

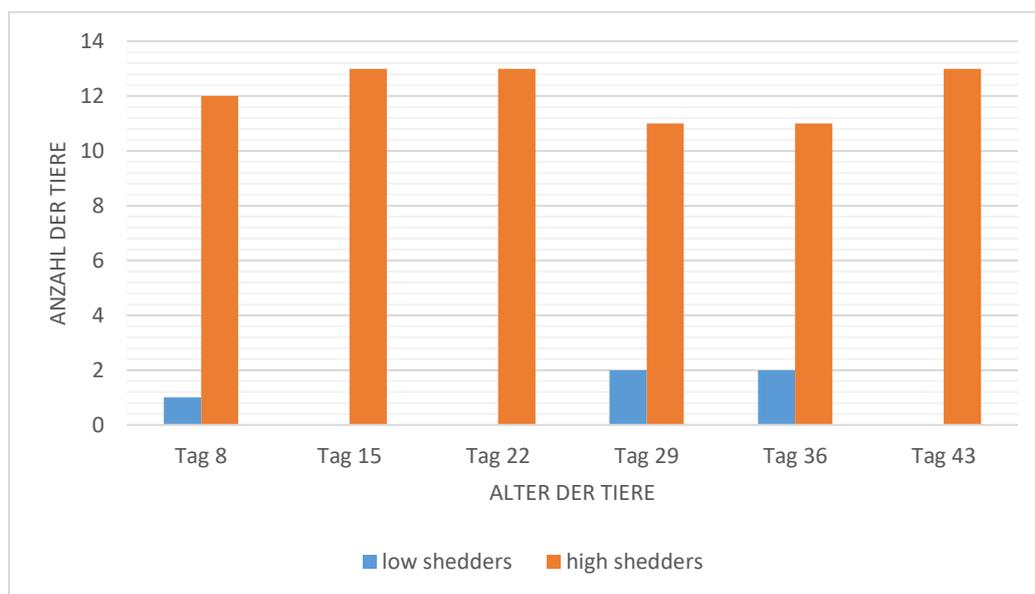


Abbildung 8: Anzahl der Tiere und deren Ausscheidungsrate über den gesamten Untersuchungszeitraum.

Dies resultierte darin, dass 94% der Tiere der Gruppe der „high shedder“ zugeordnet werden konnten (Abbildung 9).

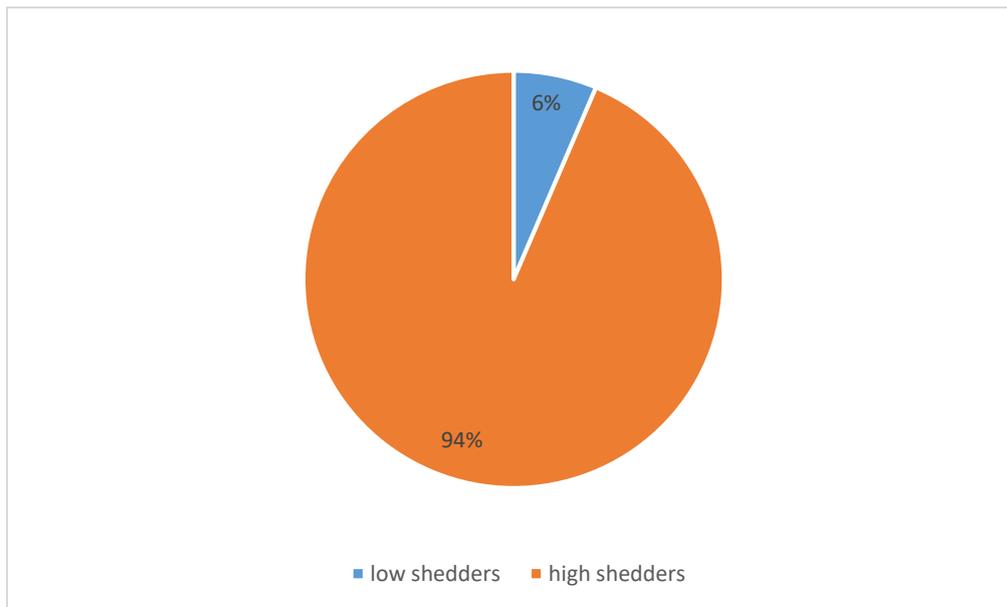


Abbildung 9: Prozentuelle Verteilung der Ausscheidungsrate von *S. Infantis* der Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum

4.4. Ausscheidungsrate (Shedding) von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 2

Beim ersten Untersuchungszeitpunkt erwies sich ein Tier als negativ. Am zweiten und dritten Untersuchungszeitpunkt schieden alle Tiere *S. Infantis* aus, hier wies der Großteil der Tiere eine hohe Ausscheidungsrate auf (Abbildung 10).

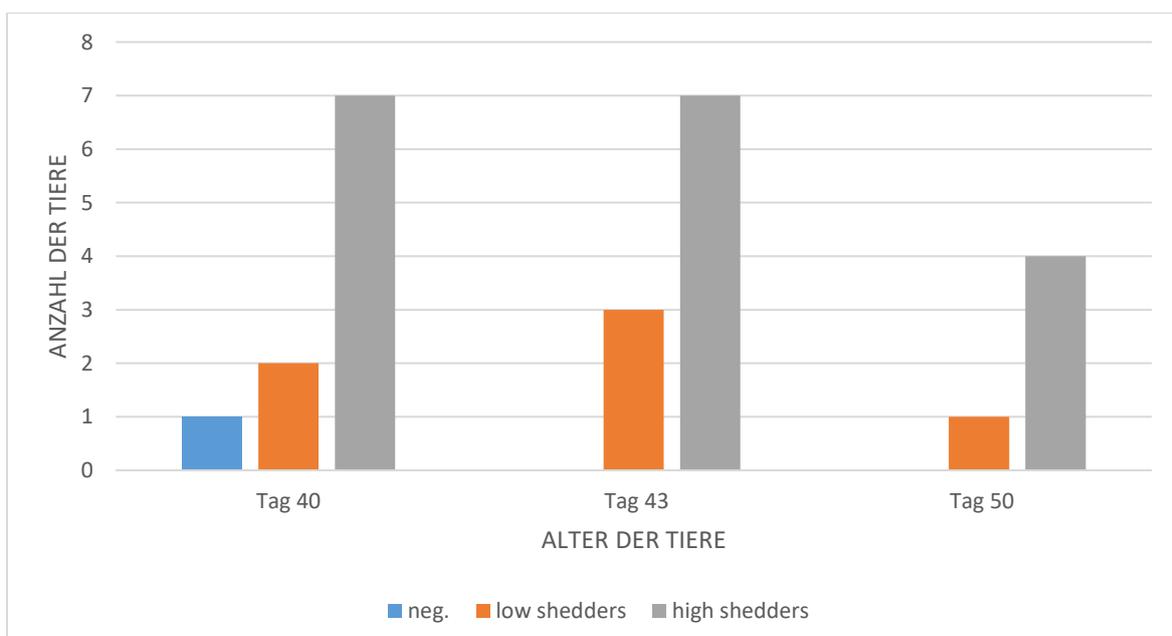


Abbildung 10: Anzahl der Tiere und deren Ausscheidungsrate über den gesamten Untersuchungszeitraum.

Dies resultierte darin, dass 72% der Tiere der Gruppe der „high shedder“, 24% der Gruppe der „low shedder“ zugeordnet werden konnten (Abbildung 11).

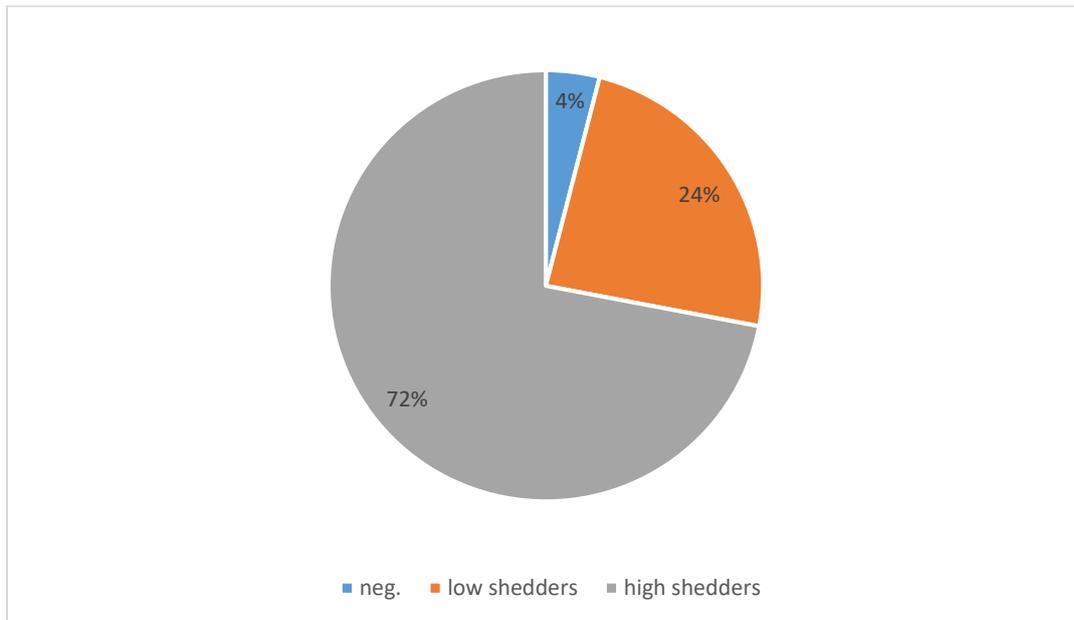


Abbildung 11: Prozentuelle Verteilung der Ausscheidungsrate von *S. Infantis* der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum

4.5. Wachstumsbeurteilung und Ausscheidungsrate (Shedding) von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 3

Alle Proben der Gruppe 3 erwiesen sich stets als negativ.

4.6. Vergleich der Wachstumsbeurteilung und Ausscheidungsrate (Shedding) von *Salmonella* Infantis anhand der Kloakentupfer: Gruppe 1 und Gruppe 2

Während der Großteil der Proben (52%) der Gruppe 1 ein mittelgradiges Wachstum zeigte, konnte im Gegensatz bei dem Großteil der Proben (61%) der Gruppe 2 ein geringgradiges

Wachstum festgestellt werden. Keine Unterschiede konnten im Bezug auf die Ausscheidungsrate gefunden werden.

5. DISKUSSION

S. Infantis ist aktuell das bedeutendste Serovar beim Mastgeflügel (EFSA, 2021). Während es beim Geflügel keine Erkrankungen hervorruft, verursacht es zunehmend Salmonellose beim Menschen (EFSA, 2021). Aktuelle Bekämpfungsstrategien auf Ebene des Mastgeflügels beruhen auf strengen Biosecuritymaßnahmen mit entsprechenden Reinigungs- und Desinfektionsprogrammen. Aus dem Feld wird allerdings berichtet, dass es oft zu wiederkehrenden Infektionen auf kontaminierten Betrieben kommt, und sich somit eine Eradikation als äußerst schwierig darstellt. In vitro Untersuchungen zeigten auch auf, dass die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln nicht nur mit dem Verschmutzungsgrad der Stallungen zusammenhängt, sondern auch vom *S. Infantis* Isolat selbst beeinflusst werden können. Zudem wurde gezeigt, dass es trotz akkurater Anwendung von Desinfektionsmitteln zu einer Revitalisierung von *S. Infantis* kommen kann (Drauch et al., 2020). Deshalb wäre eine Keimreduktion im Tier eine Möglichkeit, um die Anzahl humaner Infektionen zu reduzieren. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel zu untersuchen, ob sich die ausgeschiedene Menge an *S. Infantis* unterscheidet, wenn sich die Tiere zu einem frühen oder einem späteren Zeitpunkt infizieren.

Studien haben bereits gezeigt, dass ein unterschiedliches Sheddingverhalten bei verschiedenen bakteriellen Erregern eine große Bedeutung für das Infektionsgeschehen haben (Matthews et al, 2006; Slater et al., 2016). Infizierte Tiere, die höhere Mengen an Salmonellen beherbergen und ausscheiden im Vergleich zu den anderen Tieren einer Herde werden als sogenannte „high shedders“ oder „super-shedders“ bezeichnet (Kempf et al., 2020). Diese „high shedders“ spielen eine wesentliche Rolle in der Übertragung des Erregers und sind somit auch im Fokus für epidemiologische Studien und Krankheitskontrolle. Oft handelt es sich um eine kleine Gruppe an Tieren, die allerdings das Infektionsgeschehen antreiben (Woolhouse et al, 1997). Es wurde früher schon angemerkt, dass Kontrollstrategien häufig daran scheitern, dass sie das heterogene Sheddingverhalten nicht berücksichtigen (Matthews et al., 2006). Tiere, die eine hohe Salmonellen-Ausscheidungsrate haben, kontaminieren die Umgebung und führen somit zur Infektion weiterer Tiere und schlussendlich zu einer vermehrten Kontamination von Fleischprodukten (Kempf et al., 2020).

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Wachstumsbeurteilung von Direkt-Kulturen der Kloakentupfer infizierter Tiere gezeigt werden, dass die Menge an Salmonellen bei einer früheren Infektion (1. Lebenstag) höher waren im Vergleich zu einer späteren Infektion (3. Lebenswoche). Eine mögliche Ursache hierfür kann der Einfluss der Microbiota des Darmes sein, da gezeigt werden konnte, dass Darmbakterien von adulten Hühnern, die auf Küken übertragen wurden, einen schützenden Effekt vor einer Salmonellenkolonisierung hatten als Darmbakterien von jüngeren Hühnern (Varmuzova et al., 2016).

Obwohl Unterschiede in der Menge an Salmonellen bei den Kloakentupfern gefunden wurden, konnte kein Unterschied in der Ausscheidungsrate zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Hier konnte der Großteil der Tiere beider Gruppen den „high shedders“ zugeordnet werden.

Die aktuelle Studie zeigt erstmalig, dass die Ausscheidungsrate *S. Infantis* infizierter Tiere nicht vom Infektionszeitpunkt abhängig ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Lebensmittelbedingte Infektionen mit Salmonellen zählen zu den weltweit häufigsten Ursachen humaner Erkrankungen. *S. Infantis* ist aktuell das bedeutendste Serovar beim Mastgeflügel und steht im Zusammenhang mit einer zunehmenden Anzahl an Salmonellose Ausbrüchen beim Menschen. Jegliche Reduktion an *S. Infantis* im Masthuhn stellt eine Möglichkeit dar, die Anzahl humaner Infektionen zu reduzieren. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel zu untersuchen, ob sich die ausgeschiedene Menge an *S. Infantis* unterscheidet, wenn sich die Tiere zu einem frühen oder einem späteren Zeitpunkt infizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Wachstumsbeurteilung von Direkt-Kulturen der Kloakentupfer infizierter Tiere gezeigt werden, dass die Menge an Salmonellen bei einer früheren Infektion (1. Lebenstag) höher waren im Vergleich zu einer späteren Infektion (3. Lebenswoche). Obwohl Unterschiede in der Menge an Salmonellen bei den Kloakentupfern gefunden wurden, konnte kein Unterschied in der Ausscheidungsrate zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Hier konnte der Großteil der Tiere beider Gruppen den „high shedders“ zugeordnet werden. Die aktuelle Studie zeigt erstmalig, dass die Ausscheidungsrate *S. Infantis* infizierter Tiere nicht vom Infektionszeitpunkt abhängig ist.

Foodborne infections with *Salmonella* are among the most common causes of human diseases worldwide. *S. Infantis* is currently the most important serovar in broiler poultry and is associated with an increasing number of human salmonellosis outbreaks. Any reduction in *S. Infantis* in broilers represents an opportunity to reduce the number of human infections. The aim of the present study was to investigate whether the amount of *S. Infantis* excreted differs when the animals become infected at an earlier or later time point. In the present work, the growth assessment of direct cultures of the cloaca swabs of infected animals showed that the amount of *Salmonella* was higher in an earlier infection (1st day of life) compared to a later infection (3rd week of life). Although differences were found in the amount of *Salmonella* in the cloacal swabs, no difference in shedding rate could be found between the two groups. Here the majority of the animals of both groups could be assigned to the "high shedders". The current study shows for the first time that the excretion rate of *S. Infantis* infected animals is not dependent on the time of infection.

7. LITERATUR

European Food Safety Authority (2021): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406.

Moraes, J.O., Cruz, E.A., Souza, E.G.F., Oliveira, T.C.M., Alvarenga, V.O., Pena, W.E.L., Sant'Ana, A.S., Magnani, M. (2018): Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. Int. J. Food Microbiol. 281, 90-100. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.011.

Drauch, V., Kornschöber, C., Palmieri, N., Hess, M., Hess, C., 2021. Infection dynamics of *Salmonella* Infantis strains displaying different genetic backgrounds—with or without pESI-like plasmid—vary considerably. Emerging Microbes & Infections 10, 1471-1480. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108660.

Gast, R.K., Porter, R.E. (2020): *Salmonella* Infections. In Swayne, D.E., Boulianne, M., Logue, C.M., McDougald, L.R., Nair, V., Suarez, D.L.: Diseases of Poultry, 14th Edition. Wiley Blackwell, USA. Seiten 719-753.

Barrow, P.A., Freitas Neto, O.C. (2011): Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. Avian Pathol. 40, 1-13. doi: 10.1080/03079457.2010.542575.

Berchieri, A., Murphy, C.K., Marston, K., Barrow, P.A. (2001): Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. Avian Pathol. 30, 221-231. doi: 10.1080/03079450120054631.

Geflügelhygieneverordnung 2007, Fassung vom 11.04.2022:
<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung/Bundesnormen/20005323/Gefl%20c3%bcgelhygie%20neverordnung%202007%2c%20Fassung%20vom%2011.04.2022.pdf>.

DIN EN ISO 6579-1:2020-08: Microbiologie der Lebensmittelkette – Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen – Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017 + Amd. 1:2020).

Prunic, B., Milanov, D., Velhner, M., Pajic, M., Pavlocic, L., Mistic, D. (2016): Clonal persistence of *Salmonella enterica* serovars Montevideo, Tennessee, and Infantis in feed factories. J. Infect. Dev. Ctries. 10, 662-666. doi: 10.3855/jidc.7313.

Ortali, G. (2019): Experiences gathered from the field: Hygiene practices and unsolved questions: about recontamination. Mini-Symposium on *Salmonella Infantis* Infections in Poultry. (10th October 2019, Vienna, Austria).

Pless, P., Mitsch, P., Schliessnig, H. (2019): News about the “*Salmonella Infantis* Action Plan” in Styria. Mini-Symposium on *Salmonella Infantis* Infections in Poultry. (10th October 2019, Vienna, Austria).

Sevilla-Navarro, S., Catala-Gregori, P., Garcia, C., Cortes, V., Marin, C. (2020): *Salmonella Infantis* and *Salmonella Enteritidis* specific bacteriophages isolated from poultry faeces as a complementary tool for cleaning and disinfection against *Salmonella*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 68:101405. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101405.

Hald, B., Olsen, A., Madsen, M. (1998): *Tpyheae stercorea* (Coleoptera: Mycetophagidae), a carrier of *Salmonella enterica* serovar Infantis in a Danish broiler house. J. Econ. Entomol. 91, 660-664. doi: 10.1093/jee/91.3.660.

Olsen, A.R., Hammack, T.S. (2000): Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydroteaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. J. Food Prot. 63, 958-960. doi: 10.4315/0362-028x-63.7.958.

Lapuz, R.R.S.P., Umali, D.V., Suzuki, T., Shirota, K., Katoh, H. (2012): Comparison of the prevalence of *Salmonella* infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities. Avian Dis. 56, 29-34. doi: 10.1637/9704-030711-Reg.1.

Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F. (2018): Oral vaccination with a live *Salmonella Enteritidis*/Typhimurium bivalent vaccine in layers induces cross-protection against caecal and internal organ colonization by *Salmonella Infantis* strain. Vet. Microbiol. 218, 7-12. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.022.

Crouch, C.F., Pugh, X., Patel, A., Brink, H., Wharmby, C., Watts, A., van Hulten, M.C.W., de Vries, S.P.W. (2020): Reduction in intestinal colonization and invasion of internal organs after challenge by homologous and heterologous serovars of *Salmonella enterica* following

vaccination of chickens with a novel trivalent inactivated *Salmonella* vaccine. *Avian Pathol.* 49, 666-677. doi: 10.1080/03079457.2020.1814200.

Slater, N., Mitchell, R.M., Withlock, R.H., Fyock, T., Pradhan, A.K., Knuper, E., Schukken, Y.H., Louzoun, Y. (2016): Impact of the shedding level on transmission of persistent infections in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *Vet. Res.* 47, 38. doi: 10.1186/s13567-016-0323-3.

Matthews, L., McKendrick, I.J., Ternent, H., Gunn, G.J., Synge, B., Woolhouse, M.E.J. (2006): Super-shedding cattle and transmission dynamics of *Escherichia coli* O157. *Epidemiol. Infect.* 134, 131-142. doi: 10.1017/S0950268805004590.

Kempf, F., Menanteau, P., Rychlik, I., Kubasova, T., Trotureau, J., Virlogeux-Payant, I., Schaeffer, S., Schouler, C., Drumo, R., Guitton, E., Velge, P. (2020): Gut microbiota composition before infection determines the *Salmonella* super- and low-shedder phenotypes in chicken. *Microb. Biotechnol.* 13, 1611-1630. doi: 10.1111/1751-7915.13621.

Woolhouse, M.E., Dye, C., Etard, J.F., Smith, T., Charlwood, J.D., Garnett, G.P., Hagan, P., Hii, J.L., Ndhlovu, P.D., Quinnell, R.J., Watts, C.H., Chandiwana, S.K., Anderson, R.M. (1997): Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 338-342. doi: 10.1073/pnas.94.1.338.

Varmuczova, K., Kubasova, T., Davidova-Gerzova, L., Sisak, F., Havlickova, H., Sebkova, A., Faldynova, M., Rychlik, I. (2016): Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. *Front. Microbiol.* 7, 957. doi: 10.3389/fmicb.2016.00957.

8. **ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Taxonomie der Salmonelle.....	3
Abbildung 2: Darstellung der Beurteilung des Wachstumsgrades von S. Infantis bei Direktausstrichen	6-7
Abbildung 3: Wachstumsverhalten von S. Infantis MSR 16/01939 auf MSRV Agar und einer Negativkontrolle im Vergleich nach 24h Bebrütung.....	8
Abbildung 4: Darstellung der Wachstumsbeurteilung von S. Infantis anhand der Kloakentupfer der Gruppe 1 über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	9
Abbildung 5: Prozentuelle Verteilung des Wachstums von S. Infantis anhand des Direktausstriches der Kloakentupfer der Gruppe 1 über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	10
Abbildung 6: Darstellung der Wachstumsbeurteilung von S. Infantis anhand der Kloakentupfer der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum	11
Abbildung 7: Prozentuelle Verteilung des Wachstums von S. Infantis anhand des Direktausstriches der Kloakentupfer der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum	11
Abbildung 8: Anzahl der Tiere und deren Ausscheidungsrate über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	12
Abbildung 9: Prozentuelle Verteilung der Ausscheidungsrate von S. Infantis der Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	13
Abbildung 10: Anzahl der Tiere und deren Ausscheidungsrate über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	13
Abbildung 11: Prozentuelle Verteilung der Ausscheidungsrate von S. Infantis der Gruppe 2 über den gesamten Untersuchungszeitraum.....	14
Tabelle 1: Systematik der Salmonellen.....	2
Tabelle 2: Angaben zu den Gruppen.....	5