

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut/Klinik für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen

(LeiterIn: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl.ECVPH)

**Prophageninduktion in *Salmonella*, Relevanz für eine
Antibiotikaresistenzübertragung**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Lisa Trofeit

Wien, im Mai 2021

Betreuerin:

Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

PD Dr. Joachim Spargser, Dipl. ECVM

Institut für Mikrobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Diplomarbeit in jeglicher Form unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich herzlichst bei meiner Betreuerin, Frau Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Friederike Hilbert, Dipl.ECVPH bedanken, die mir das Thema dieser Diplomarbeit zur Verfügung gestellt hat und mich sowohl während der Laborarbeit als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit immer tatkräftig unterstützt hat und immer ein offenes Ohr hatte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Dimitrij Sofka, welcher mir bei der Arbeit im Labor immer zur Seite gestanden ist und mir alle Fragen bezüglich der Vorbereitung und Durchführung der Versuche beantwortet hat.

Ein großes Dankeschön richte ich auch an Mag. Elisabeth Sattler, Studienkollegin und Freundin, welche mich durch sowohl die schönsten als auch die schlimmsten Momente des Studiums begleitet hat und mir sowohl seelisch als auch fachlich immer unterstützt hat.

Mein größter Dank geht an meine Familie und Freunde. Meiner Familie, insbesondere meine Mutter, mein Bruder und meine Großeltern möchte ich sowohl für den emotionellen als auch finanziellen Rückhalt danken.

Vielen Dank an meine Freunde, welche mir immer beigestanden sind und an mich geglaubt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund danken, welcher mir in der letzten Studienphase besonders zur Seite gestanden ist und mir dafür Kraft und Motivation gespendet hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Salmonella enterica	3
2.1.1 Humanmedizinische Erkrankungen	3
2.1.2 Veterinärmedizinische Aspekte.....	3
2.2 Antibiotikaresistenzen in Salmonella.....	4
2.3 Bakteriophagen	5
2.3.1 Aufbau der Phagen.....	6
2.3.2 Temperente Phagen.....	6
2.3.3 Lytische Phagen	7
2.3.4 In Salmonellen vorkommende Phagen	8
2.3.5 Einsatz von Phagen.....	8
3. Material und Methode	11
3.1 Materialien	11
3.1.1 Geräte	11
3.1.2 Bakterien	11
3.1.3 Chemikalien und Primer	12
3.1.4 Nährmedien.....	12
3.2 Methodik.....	13
3.2.1 Anzüchtung der zu testenden <i>Salmonella</i> Isolate	13
3.2.2 Prophageninduktion mittels H ₂ O ₂	13
3.2.3 Gewinnung des Gesamtlysats	13
3.2.4 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in Prophagen.....	15
4. Ergebnisse.....	18
4.1 Induzierbare Phagen	18

4.2	Antibiotikaresistenzgene	18
4.3	Resistenzgene	20
5.	Diskussion	21
6.	Zusammenfassung	23
7.	Abstract	24
8.	Literaturverzeichnis	25
9.	Anhang	30
10.	Abbildungsverzeichnis	37
11.	Tabellenverzeichnis	38

1. Einleitung und Fragestellung

S. enterica hat als einer der bedeutsamsten zoonotischen Erreger große ökonomische Relevanz. Weltweit gibt es laut WHO ungefähr 550 Millionen gastrointestinale Erkrankungen pro Jahr und *Salmonella* ist einer der Haupterreger (Sevilla-Navarro et al. 2020).

Der häufigste Ursache für eine Salmonellose weltweit ist *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (Mølback et al. 2002), welcher historisch gesehen, im Gegensatz zum Serovar Typhimurium, bis vor 10 Jahren kaum Multiresistenzen gegen Antibiotika zeigte (Threlfall 2002). Dennoch wurde auch bei diesem Serovar in den letzten Jahren eine steigende Anzahl an antibiotikaresistenten Isolaten beobachtet (Mølback et al. 2002; Huang et al. 2018). Diese steigenden Zahlen von multiresistenten *Salmonella* Isolaten erhöhen die Notwendigkeit, Alternativen in der Behandlung einer generalisierten Salmonellose zu finden.

Das Auftreten von Multiresistenzen ist nicht auf Salmonellen beschränkt, sondern betrifft eine Vielzahl von humanen und tierischen Krankheitserregern. Eine vielversprechende Alternative bei schwer oder unzureichend therapierbaren bakteriellen Infektionserkrankungen zu der herkömmlichen Antibiotikatherapie könnte in Zukunft die sogenannte Phagentherapie darstellen. Dabei werden sogenannte Bakteriophagen – dies sind Viren, die Bakterien befallen – eingesetzt, um gezielt die krankheitsauslösenden Bakterien zu reduzieren (Young und Gill 2015).

Ein weiteres Anwendungsgebiet im Bereich der Bakteriophagen ist die Lebensmittelhygiene, in der spezifische rein lytische Phagen in der Produktion eingesetzt werden, um Lebensmittelpathogene oder Verderbniserreger zu reduzieren oder zu eliminieren. Diese Art der Anwendung erfolgt auch bereits in einigen europäischen Ländern z. B. um eine Kontamination von *Listeria monocytogenes* in der Käseproduktion, oder bei der Herstellung von Kochpökelfleisch zu reduzieren und damit die Lebensmittelsicherheit zu erhöhen. Der Einsatz von Phagen im Umfeld der tierischen und pflanzlichen Lebensmittelherstellung und Verarbeitung ist in Diskussion, da dieser Einsatzbereich nicht ohne Vorbehalte ist (Oh und Park 2017). Insbesondere werden eine Resistenzbildung der Bakterien gegenüber den Phagen (Fister et al. 2019), die Bildung von Hybridphagen mit natürlich vorkommenden Phagen (McDonnell et al. 2016), aber auch die horizontale Übertragung von Antibiotikaresistenzen (Shousha et al. 2015) beschrieben.

In dieser Arbeit wird der Hypothese nachgegangen, ob Prophagen, die aus verschiedenen Isolaten von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und Enteritidis propagiert werden können, Antibiotikaresistenzgene enthalten.

2. Literaturübersicht

2.1 *Salmonella enterica*

S. enterica ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, fakultativ intrazelluläres Bakterium (Knodler und Elfenbein 2019). Diese Spezies wird in sechs Subspezies unterteilt, zusätzlich können weltweit über 3000 Serovare unterschieden werden. Diese kann man weiter anhand ihrer flagellaren, Kohlenhydrat- und Lipidstrukturen differenzieren (Coburn et al. 2007).

Salmonella Serovare werden hinsichtlich der humanen Erkrankungen, die sie verursachen, in zwei Gruppen eingeteilt: Typhoide Serotypen wie *S. Typhi*, *S. Paratyphi* und *S. Sendai*, die als Auslöser einer typhoidalen humanen Erkrankung gelten. Zu den nicht typhoiden Serovaren mit breitem Wirtspektrum zählen z. B. *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Diese sind auch für die meisten intestinalen *Salmonella*-assoziierten Erkrankungen beim Menschen verantwortlich (Kaiser et al. 2000).

2.1.1 Humanmedizinische Erkrankungen

Die humane Infektion mit *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* äußert sich meist durch lokal auf den Magendarmtrakt begrenzte Symptome wie Unterleibschmerzen, Durchfall, Übelkeit und Erbrechen, können aber auch Fieber und Kopfschmerz verursachen (Suttorp et al. 2003).

Die Symptome treten meist 12-72 Stunden nach der Konsumation von kontaminierten Lebensmitteln auf und dauern meist 4-7 Tage an. Die Infektion ist vorwiegend selbstlimitierend, da in diesen Fällen die *Lamina propria* der epithelialen Zellen intakt bleibt. Somit ist der Einsatz von antimikrobiellen Substanzen wie Ampicillin, Gentamicin, Trimethoprim/Sulfamethaxazol oder Ciprofloxazin bei den meisten *Salmonella* Infektionen nicht notwendig. Ein Einsatz dieser antimikrobiellen Therapie kann allerdings bei besonders empfänglichen Patientengruppen wie zum Beispiel bei Kindern unter 5 Jahren, bei immunsupprimierten oder bei älteren Personen, insbesondere wenn sich ein typhoides Krankheitsbild entwickelt, nötig sein (Oh und Park 2017).

2.1.2 Veterinärmedizinische Aspekte

Nutztiere stellen das wichtigste Reservoir dieser lebensmittelassoziierten Zoonoseerreger dar. Salmonellen können von Nutztieren direkt oder über Lebensmittel tierischen Ursprungs auf den Menschen übertragen werden und zur humanen Erkrankung führen, wodurch sich die hohe Anzahl an nicht-typhoiden *Salmonella* Erkrankungen erklären lässt (McClelland et al. 2001).

Bei den Nutztieren ist im Gegensatz zum Menschen die Ausprägung klinischer Symptome durch *S. Enteritidis* und *S. Typhimurim* selten. Eine Ausnahme stellen Jungtieren dar, die bei Besiedelung oftmals Erkrankungssymptome zeigen können. Beide *Salmonella* Serovare sind jedoch in der Lage, den Gastrointestinaltrakt von allen Nutztieren zu besiedeln und sich durch horizontale Übertragung über den fäkal-oralen Weg in der Herde zu verbreiten. Bei der Schlachtung und beim Melkprozess ist die fäkale Kontamination von Fleisch und Milch möglich. *S. Enteritidis* kann zudem bei einzelnen Legehennen den Reproduktionstrakt besiedeln, was schlussendlich zu einer Kontamination von Eiern führen kann (Kaiser et al. 2000). Als die wichtigsten durch *Salmonella* kontaminierten Lebensmitteln gelten Hühnerfleisch und Hühnereier (Mohammed I. et al. 2015).

2.2 Antibiotikaresistenzen in *Salmonella*

In den letzten Jahrzehnten konnte man eine rasche Steigerung der Prävalenz von Mehrfachresistenzen (Multi Drug Resistance - MDR) in *Salmonella* beobachten. Dies ist sowohl auf den Einsatz von Antibiotika in der Veterinär-, als auch in der Humanmedizin, sowie in der Verbreitung von resistenten Klonen von *Salmonella* in der Umwelt zurückzuführen (Ghoddusi et al. 2019). Ebenso werden Antibiotikarückstände in der Umwelt als mögliche Ursachen diskutiert (Aminov 2009).

Mølback et al. (2002) berichteten in einer in Dänemark durchgeführten Studie von steigenden Resistenzen des Serovars *Enteritidis* gegenüber Chinolonen bei humanen Isolaten. Dies ist bedenklich, da fluorierte Chinolone Mittel der Wahl bei der Behandlung einer typhoidalen Salmonellose in der Humanmedizin sind (Mølback et al. 2002). Ebenso werden immer häufiger Mehrfachresistenzen gegenüber Antibiotika in tierischen Salmonellaisolaten, gegen häufig eingesetzte Antibiotika, wie Ampicillin, Tetrazyklin und Sulphomethoxazol nachgewiesen (El-Sharkawy et al. 2017, Mahmoud et al. 2018a). Aber auch Resistenzen gegenüber antibiotischen Substanzen, deren Anwendung mittlerweile verboten wurde, wie Chloramphenicol, sind in hoher Zahl zu finden. Des Weiteren gibt es zahlreiche Studien, die belegen, dass idente resistente Klone verschiedener Serovare sowohl bei humanen Erkrankungen als auch bei Rinder- und Geflügelbeständen zu finden sind. Daher wird angenommen, dass die Mehrzahl diese zoonotischen Infektionserreger, die eine humane Erkrankung verursachen, tierischen Ursprungs sind (Threlfall 2002; Ghoddusi et al. 2019; Borges et al. 2017). In den meisten dieser Studien wurden Vertreter der Serovare Typhimurium und *Enteritidis* untersucht (Mahmoud et al. 2018b, Ghoddusi et al. 2019).

Diese zwei Serovare unterscheiden sich aber hinsichtlich des Auftretens von antibiotikaresistenten Isolaten. So konnte z. B. Soo Jin Yang et al. bei den von ihnen untersuchten *S. Typhimurium* Isolaten alle (100 %) Multiresistenzen nachweisen, bei *S. Enteritidis* Isolaten traf dies jedoch nur auf 26,7 % der untersuchten Proben zu (Soo Jin Yang et al. 2001). Auch eine österreichische Studie konnte zeigen, dass sich unterschiedliche Serovare bezüglich ihrer Antibiotikaresistenzen stark unterscheiden (Mayrhofer et al., 2004)

2.3 Bakteriophagen

Unter Bakteriophagen, kurz Phagen, versteht man Viren, welche ausschließlich Bakterien befallen. Durch ihre hohe Wirtsspezifität wird versucht sie seit ihrer Entdeckung im Jahr 1915 in der Humanmedizin, wie auch in der Veterinärmedizin und in verschiedensten landwirtschaftlichen Bereichen als Bakterizide einzusetzen (Sillankorva et al. 2012).

Dabei werden lytische Bakteriophagen verwendet, um gezielt die krankheitsauslösenden Bakterien zu reduzieren (Young und Gill 2015). Bakteriophagen können nicht in eukaryotische Zellen eindringen und haben daher kein Infektionspotential in tierischen oder humanen Patienten. Allerdings kommen Bakteriophagen im menschlichen und tierischen Körper natürlicherweise vor, da sie Bakterien in all ihren Lebensumgebungen begleiten. Man findet sie als Teil des Mikrobioms im Darm, auf Schleimhäuten, aber auch als Begleiter von bakteriellen Erkrankungen z. B. im Blut oder auf bakteriell infizierten Hautwunden (Chibani-Chennoufi et al. 2004, Gaidelytė et al. 2007). In wie weit diese natürlich vorkommenden Phagen eine Bedeutung für die Erkrankung besitzen und diese mit dem Immunsystem des tierischen und menschlichen Körpers oder mit therapeutisch eingesetzten Phagen reagieren, ist noch unzureichend erforscht (Gordillo Altamirano und Barr 2019).

Natürlicherweise sind Phagen in allen Bereichen in denen ihre Wirte, Bakterien, vorkommen zu finden. Die Beziehung zwischen Bakterien und Phagen ist überaus komplex und hat weitreichende Konsequenzen, welche von der Veränderung bakterieller Virulenzen über eukaryotische Fitness bis hin zum Kohlenstoffkreislauf reichen (Díaz-Muñoz und Koskella 2014).

Sowohl die Vielzahl als auch die Diversität von Phagen tragen zu dem großen Einfluss auf lokale und globale Ökosysteme bei. Durch die Kontrolle der Größe der bakteriellen Population tragen sie zu einer Umverteilung von Nährstoffen in der Umwelt bei (Olszak et al. 2017).

Man findet Phagen in nahezu jedem Süßwasser und in jedem Meer (Díaz-Muñoz und Koskella 2014). Alleine im marinen Ökosystem tragen Phagen dazu bei, dass ca. 10^8 Tonnen pro Tag organischen Kohlenstoffs freigesetzt wird (Brussaard et al. 2008).

Auch in anderen lebenden Organismen sind Phagen zu finden, wodurch sie den Weg in unsere Lebensmittel finden. Diese natürlich vorkommenden Phagen sind in der Lebensmittelindustrie nachteilig. Ein versehentlicher Befall von Starterkulturen, die in der Fermentation von Lebensmitteln eingesetzt werden, kann einen negativen Einfluss auf die organoleptischen Eigenschaften des fehlgereiften Endproduktes haben – sei es Geschmack, Aroma oder Konsistenz. Es ist sogar möglich, dass kontaminierende Phagen zu einem partiellen oder totalen Fermentationsfehler führen (Mahony et al. 2020).

Primär gelangen die störenden Phagen bei der Herstellung von Milchprodukten durch die Rohmilch in den Produktionszyklus. In der Rohmilch findet man die Phagen entweder als frei liegende Virionen oder als Prophagen in natürlich vorkommenden Milchsäurebakterien vor (Lucía Fernández et al. 2017).

Haaber et al. konnte 2016 in einer Studie nachweisen, dass sogar eine Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen über natürlich vorkommende Prophagen möglich ist (Haaber et al. 2016).

2.3.1 Aufbau der Phagen

Phagen besitzen als Erbmaterial entweder DNA oder RNA, das sie mit einem polyedrischen Kapsidprotein schützen. Eine Ausnahme stellen filamentöse Phagen dar. Das Kapsidprotein ist mit einem Schwanz verbunden, der für die Bindung an spezifische Zellwandstrukturen der Bakterien verantwortlich ist und ein Eindringen der Erbinformation ermöglicht (Oh und Park 2017).

Es gibt für Phagen zwei Wege, ihre Erbinformation zu vermehren: Entweder diese wird in der Bakterienzelle abgeschrieben und es werden neue Phagenpartikel aufgebaut. Nachdem genügend Phagen gebildet wurden, werden sogenannte „späte Phagengene“ aktiviert, wodurch lysierende Stoffe synthetisiert werden, die die Bakterienzellwand von innen auflöst. Nun werden diese neu produzierten Viren freigesetzt (lytischer Zyklus). Andererseits können sie ihre Erbinformation in das bakterielle Kernäquivalent integrieren (Prophagen), ohne den Tod der Wirtszelle herbeizuführen. Diese neue Erbinformation wird bei der bakteriellen Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben (lysogener Zyklus) (Kropinski, Andrew M et al. 2007). Dieser lysogene Zyklus kann jederzeit in einen lytischen Zyklus übergehen.

2.3.2 Temperente Phagen

Bakteriophagen, welche den lysogenen Zyklus durchlaufen, werden auch temperente Phagen genannt. Diese integrieren ihre DNA in die des Bakteriums, welches sich mit dieser neuen

horizontal erworbenen DNA vermehrt. Die Phagen DNA, welche nun Teil des Kernäquivalents von Bakterien ist, wird ebenfalls repliziert (Ofir 2018). Ein Bakterium, welches ein komplettes Set an Phagengenen enthält, nennt man lysogen, während man das integrierte Genom der Phage als Prophage bezeichnet. Ein lysogenes Bakterium reproduziert die Phagen-DNA kontinuierlich. Wird jedoch die Bakterienzelle „unter Stress“ gesetzt – wie zum Beispiel durch die Einwirkung von UV-Strahlung, Hitze, oder durch Behandlung mit anderen induzierenden Substanzen wie Mitomycin C, aktiviert sich die Phagen DNA und initiiert den lytischen Zyklus (Kropinski, Andrew M et al. 2007). Der lysogene Zyklus kann auch Vorteile für das Bakterium bringen, da Prophagen ihre Wirtszelle oft vor Sekundär- oder Superinfektionen durch andere Phagen schützen können (Chaturongakul und Ounjai 2014).

Wenn ein temperenter Phage mutiert, kann es vorkommen, dass er seine Fähigkeit verliert, den vollständigen lytischen Zyklus zu durchlaufen. Damit ist er nicht mehr in der Lage, infektiöse Partikel zu produzieren, wird jedoch weiterhin als Teil des Wirtschromosoms repliziert (Wahl et al. 2019). Diese Phagen-DNA in der Bakterienzelle bezeichnet man als kryptische Phagen. Temperente Phagen können neben phagen-spezifischer Erbinformation auch bakterielle Erbinformation enthalten und zwischen verschiedenen Bakterienzellen weiterverbreiten.

2.3.3 Lytische Phagen

Streng lytische oder virulente Phagen hingegen befallen die Wirtszelle und zwingen sie dazu, Nachkommen zu produzieren (Wahl et al. 2019). Die Wirtszelle stellt dabei sowohl die benötigten Komponenten als auch ihr ganzes System zur Vervielfältigung zur Verfügung. Danach wird die Zelle meist durch Lyse zerstört, welches ein Freisetzen der Nachkommen zur Folge hat. Dies kann durch sogenannte Plaques auf bakteriellen Nährböden sichtbar gemacht werden. Diese entstehen, wenn auf einem Bakterienrasen eine Bakterienzelle durch Phagen befallen und lysiert wird. Dies führt dann zu einer Infektion und einem Absterben benachbarter Zellen und der bakterielle Zellrasen wird an dieser Stelle aufgelöst (Rabsch 2007).

Die Trennung zwischen lytischen und lysogenen Phagen ist nicht immer möglich, auch nicht aufgrund der vollständigen Genomanalyse der Phagen (Hobbs und Abedon 2016). Das bedeutet es gibt Phagen, die sich sowohl lytisch als auch lysogen in Abhängigkeit des Wirts und der Umwelteinflüsse verhalten (Erez et al. 2017).

2.3.4 In Salmonellen vorkommende Phagen

Mittels CoreGenom Analysen konnte man die in Salmonellen vorkommenden Phagen in fünf Gruppen (P27-like, P2-like, lambdoid, P22-like und T7-like) und drei Sonderfälle (ϵ 15, KS7 und Felix O1) unterteilen (Kropinski, Andrew M et al. 2007).

Zu den P27-like Phagen zählt nur ein einziger Typ, ST64B. Die P2 Gruppe umfasst Fels-2, SopE Φ und PSP3 Phagen, welche der Familie der *Myoviridae* angehören. Die Lambdoid Gruppe enthalten Gifsy-1, Gifsy-2 und Fels-1 Phagen, die zur Familie der *Siphoviridae* zählen. Zu den P22-like Viren gehören ϵ 34, ES18, P22, ST104 und ST64T. Das einzige Mitglied der T7-like Gruppe ist SP6 (Kropinski, Andrew M et al. 2007).

2.3.4.1 Phagen in *S. Typhimurium*

Salmonellen kann man auf Grund der sie lysierenden Phagen in sogenannte Phagentypen differenzieren (Lettini et al. 2014). Einer der ersten entdeckten, multiresistenztragenden (MDR) Phagentypen ist der Phagentyp DT104 von *S. Typhimurium*. Dieser Typ wurde erstmals 1980 im Vereinigten Königreich nachgewiesen, seit den 1990er Jahren wurde er dann auch weltweit isoliert. Phagentyp DT104 entspringt zwei verschiedener evolutionärer Ereignisse: es wurden einerseits eine Genominsel von 43-kb „*Salmonella* genomic island 1“ integriert, welche die Information für fünf Antibiotikaresistenzen (Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamid und Tetrazyclin) trägt. Andererseits wurde eine p22-like Phage ins Genom integriert (Chiu et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Vertreter von multiresistenten *S. Typhimurim* ist der Phagentyp DT193. Auch dieser besitzt fünf Resistenzen: Ampicillin Kanamycin, Streptomycin, Sulfamid und Tetrazyclin. Dieser Phagentyp wurde vor allem in Schweinen und auf Schweinefleisch gefunden (Gebreyes und Altier 2002).

Die am häufigsten vorkommenden Phagen in *S. enteritidis* sind PT1 und PT4. Hier konnte jedoch kein Zusammenhang mit einem resistenten Phänotyp festgestellt werden (Soo Jin Yang et al. 2001).

2.3.5 Einsatz von Phagen

Ein viel diskutiertes Einsatzgebiet von Bakteriophagen ist der Ersatz als antimikrobielles Biozid. Zurzeit sind in Europa keine Phagenpräparate zugelassen, außer in jenen Ländern in denen die Phagentherapie als traditionelle Medikation gilt. Allerdings wurden bereits die wichtigsten Eigenschaften für einen therapeutischen Einsatz standardisiert. Die empfohlenen

Mindestanforderungen sind in Richtlinien definiert. Die eingesetzten Phagen müssen streng lytisch sein, sie müssen eine bestätigte antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Target-Pathogen haben und es muss ein Mechanismus existieren, welcher für die Entsorgung von zerstörtem bakteriellen Zellmaterial und Endotoxinen sorgt (Ry Young und Jason J. Gill 2015). Außerdem sollte die Identität des, von dem therapeutischen Phagen angesteuerten, Rezeptors bekannt sein. Dies liefert wichtige Informationen für ein eventuelles Auftreten von bakteriellen Resistenzen gegenüber dieser Phagen und der Nutzen von kombinierten Therapieformen (Phagencocktails, gemeinsame Anwendung mit herkömmlichen Antibiotika), welche diesen bakteriellen Resistenzen und damit einer Unwirksamkeit der antibakteriellen Wirkung, vorbeugt.

Als therapeutische Phagen eignen sich nur solche mit lytischem Zyklus, da die Effektivität temperenter Phagen einerseits durch den schnellen Anstieg von Homoimmunität verlangsamt wird, andererseits könnte der lysogene Zyklus von temperente Phagen, negative Folgen haben z. B. durch die Übertragung von genetischen Informationen. Dies könnte zur Übertragung von phagenkodierten Toxinen, Antibiotikaresistenzen, oder Virulenzgenen führen (Gordillo Altamirano und Barr 2019).

Daher muss vor einem therapeutischen Einsatz von Phagen eine gründliche Diagnostik durchgeführt werden. Durch die hohe Wirtsspezifität von Phagen, muss das krankheitsauslösende Bakterium identifiziert und die Wirksamkeit der Phagen *in vitro* vorliegen. Genau diese Eigenschaft, die Spezifität, würde den Einsatz von Phagen zu einer sichereren Therapie machen, da sie die natürliche Mikroflora des Patienten nicht aus dem Gleichgewicht bringen würde (Housby und Mann 2009, Huang et al. 2018).

Da Phagen selbstreplizierend sind, bleiben sie so lange aktiv, wie sensitive Bakterien vorhanden sind. Dies würde einen weiteren Vorteil gegenüber der herkömmlichen Antibiotikatherapie darstellen (Huang et al. 2018b).

Auch in der Lebensmittelindustrie werden Phagen bereits als antimikrobielle Alternative eingesetzt.

In den USA gibt es einige zugelassene Produkte, für den Einsatz in der landwirtschaftlichen Produktion oder auch in der Lebensmittelhygiene. Hier werden vor allem sogenannte Phagencocktails, eine Mischung verschiedener Phagen Typen, eingesetzt. Dies geschieht, um bei Resistenzbildung gegen einen Phagen die lytische Aktivität durch weitere Phagen zu erhalten und damit die Wirksamkeit zu verstärken (Aless 2018).

Wall et al. führte mit ihrem Team eine vielversprechende Studie bezüglich des Einsatzes von Phagen in der Schweinehaltung durch, welche die Infektion mit *Salmonella*, im Speziellen mit

S. Typhimurium reduzieren sollte. Sie konnten zeigen, dass die fäkale Konzentration von *Salmonella* durch die Phagenanwendung um 95 % gesenkt wurde und die ileale Konzentration um 90 %. Außerdem zeigte sich, dass der eingesetzte Phagencocktail auch gegenüber anderen, nicht zu *S. Typhimurium* gehörenden Serovaren lytisch wirkte (Wall et al. 2010).

3. Material und Methode

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

- Inkubatoren
- Sterile Einmal – Pipetten (Greiner BioOne)
 - 1ml (686290)
 - 200 µl (685290)
 - 100µl (772288)
 - 20 µl (765290)
 - 10µl (765288)
- Thermoschüttler (Eppendorf: New Brunswick™ Innova 40/40R Incubator Shaker 40)
- Glaspipetten
- Automatische Pipettierhilfe (Greiner BioOne)
- Reaktionsgefäß (Greiner BioOne)
 - 1,5ml (616201)
 - 2ml (623201)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417C)
- Drigalskispatel
- Spektrophotometer (Hitachi U-1100)
- Vortexer (IKA MS2 Minishaker)
- Spritzenvorsatzfilter 0,2µm (VWR International 514-0073)
- Spritzen (Braun)
 - 2ml (4606027V)
 - 20ml (4606205V)
- Petri Schalen (LabXperts, STM 101VR20)
- PCR Thermocycler (Eppendorf MasterCycler S/N:5333 00169)
- PCR Streifen (673210; Greiner Bio One)
- Deckelkette (373270; Greiner Bio One)
- UV Transilluminator ((TFX-20M; MWG BIOTECH)
- Gelelektrophoresekammer: MultiSUB Maxi (MSMAXI20; Cleaver)

3.1.2 Bakterien

- Salmonellen aus der Stammsammlung der Abteilung für Hygiene und Technologie, Lebensmittelisolate und tierische Isolate und Standardstämme aus Stammsammlungen:
 - 50 *Salmonella* Isolate vom Serovar Typhimurium
 - 50 *Salmonella* Isolate vom Serovar Enteritidis
 - *Salmonella* Serovar Enteritidis DSM 17420 (Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

- *Salmonella* Serovar Typhimurium WT 14028 (American Type Culture Collection)

3.1.3 Chemikalien und Primer

- QuantaBio AccuStart II GelTrack PCR SuperMix (VWR International 733-2239)
- Primer (Bla TEM 1 forward 100mM; Sequenz: 5 '-cagcggtaagatccttgaga-3')
- Primer (Bla TEM1 reverse 100mM; Sequenz: 5 '-actccccgtcglgtagataa-3')
- DMSO (Fa. Molecular Probes, Inc.)
- SYBR Safe® DNA gel stain *10,000x concentrate
- 50xTAE Puffer (pH 8,5):
 - 2 M Tris
 - 1 M Essigsäure
 - 0,05M EDTA in bi-destilliertem Wasser
- 1x TAE Puffer:
 - 20ml 50X TAE in 980 ml in bi-destilliertem Wasser
- Loading buffer (6x) (25-2021; peqGOLD)
- DNA-Leiter, 1 kb (25-2030; peqGOLD)

3.1.4 Nährmedien

- LB Agar Miller (Thermo Scientific™ Oxoid 10081163)
- LB Broth (VWR International OXOICM0996B)
- Agarose (VWR International 732-2789)
- MH - Broth (Oxoid CM 0405)
- ssLB Agar
- PI-Buffer (Prophage Induction Buffer):
 - 10mM CaCl₂
 - 10mM MgCl₂
 - 2mM H₂O₂
 - Mueller Hinton Broth (CM0405; Oxoid) 21g in 1 Liter Bidestillierten Wasser
- SM Buffer (Prophagen Induktionsbuffer):
 - 100mM NaCl,
 - 10mM MgSO₄
 - 50mM TrisHCl (pH 7,5)

3.2 Methodik

3.2.1 Anzüchtung der zu testenden *Salmonella* Isolate

Zunächst wurden Salmonellen Isolate auf Grund ihres Serovars aus der Sammlung der Abteilung für Hygiene und Technologie, des Institutes für Lebensmittelsicherheit, Hygiene und Technologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, ausgewählt und diese aus den Gefrierstocks angezüchtet. Dafür wurden die Gefrierstocks unter Kühlung entnommen und jeweils ein Ausstrich mit einer sterilen Öse auf LB Agar angefertigt. Diese Platten wurden bei 37°C über Nacht (24h) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde jeweils eine Einzelkolonie pro Platte entnommen, 10 ml Flüssigmedium (LB-Bouillon) beimpft und unter Schütteln (250 rpm/min) über Nacht (24h) bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Prophageninduktion mittels H₂O₂

Von der Übernachtskultur wurde 1ml in ein 2ml Reaktionsgefäß übergeführt und bei 10.000g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch Dekantieren des Überstands wurde ein Pellet gewonnen, welches in 2ml Prophage-Induction-Buffer (Mueller Hinton Broth; 10mM CaCl₂; 10mM MgCl₂; 2mM H₂O₂) gelöst wurde. Die daraus gewonnene Suspension wurde für 1 Stunde bei 30°C inkubiert.

Danach wurde Lysozym bis zu einer Endkonzentration von 200µg/ml hinzugefügt. Diese Zellsuspension wurde erneut bei 30°C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 10.000g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert und bei +4°C aufbewahrt.

3.2.3 Gewinnung des Gesamtlysats

Bei diesem Schritt wurde, der aus den mit H₂O₂ vorbehandelten Bakterienzellen gewonnene Überstand, auf das Vorhandensein von freigesetzten Prophagen getestet. Mit diesem Überstand wurde ein prophagenfreier *Salmonella* Serovar Typhimurium WT 14028 Stamm infiziert. Die bei positivem Ergebnis entstehenden Plaques wurden ausgezählt und isoliert.

3.2.3.1 Anzüchtung des Wirtstammes WT 14028

Der prophagenfreie Stamm *S. Typhimurium* WT 14028, wurde mit einer sterilen Öse aus dem Gefrierstock entnommen und auf eine frische LB Platte ausgestrichen und eine Einzelkolonie in 10ml LB-Bouillon angezüchtet.

Es wurde durch die Übertragung von 10µl der Übernachtskultur in 10ml frische LB-Bouillon und durch die Bebrütung für 3 Stunden bei 37°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf: New Brunswick™ Innova 40/40R Incubator Shaker 40) eine frische Kultur hergestellt. Die Kultur wurde auf McF von 0,5 und 1 eingestellt.

3.2.3.2 Detektion der freigesetzten Phagen

Die zwei Konzentrationen des Wirtstammes wurden wie folgt infiziert:

- a. McF ~1: 1000µl H₂O₂ induziertes Lysat + 1000µl von der Zellkultur WT 14028
- b. McF~0,5: 10 µl H₂O₂ induziertes Lysat + 1900 µl von der Zellkultur WT 14028

Durch ein Overlay Assay wurde die Plaquebildung getestet und somit aktivierte (Pro)Phagen nachgewiesen. Dazu wurde 4ml ssLBA (Semi-solid LB Agar; 0,8 % Agar) verflüssigt und auf 50°C warmgehalten, 24 µl 1M CaCl₂ hinzugefügt und gemischt.

Zu diesem Medium wurden je 2ml Bakterienzellsuspension, der zuvor angelegten Konzentrationen (McF~1 und McF~0,5) und das Lysat (wie unter 3.2.2 beschrieben) hinzugefügt und rasch vermischt. Die Mischung wurde noch flüssig auf eine LB Agarplatte geleert. Diese wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten gehärtet und danach über Nacht (24h) bei 30°C inkubiert.

3.2.3.3 Auswertung und Gewinnung des plaque-bildenden Phagenlysats

Zunächst wurden die Platten, die Plaques aufwiesen, dokumentiert. Anschließend wurde ein Gesamtlysats gewonnen, indem der Overlay in 4ml SM Buffer (100mM NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM TrisHCl pH 7,5) gelöst wurde. Der weiche Agar wurde mit dem Drigalskispatel zerkleinert, 2ml sterile LB Bouillon zugegeben und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Phagenlysats wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei 10.000g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Filtration (0,2 µm) von

den Wirtsbakterien befreit. Das so gewonnene Lysat der lysogenen Phagen wurde bei +4°C gelagert.

3.2.4 Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen in Prophagen

Der Nachweis der Antibiotikaresistenzgene der gewonnenen lysogenen Phagen wurde mittels PCR und anschließender Agarose - Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2.4.1 PCR

Das Gesamtphagenlysate wurde vor der PCR von extraviraler DNA und RNA gereinigt. Dafür wurde das Lysat mit 2U/µl DNase (QuantaBio 95159-01K) und 20mg/ml RNase (VWR; 732-3152) behandelt. Für die Durchführung wurde der Eppendorf MasterCycler verwendet. Die initiale Denaturierung des Phagenlysates erfolgte bei 94°C für 5 Minuten. Danach wurden fünfunddreißig Zyklen durchgeführt, welche jeweils aus 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei entsprechender Annealing Temperatur und 60 Sekunden bei 72°C bestanden. Die finale Elongation fand bei 72°C für 5 Minuten statt.

Tab. 1 verwendete Reaktionskomponenten und ihre Volumina

PCR-Reaktionskomponenten	Sequenz	Volumen für 20-µL Reaktion	Endkonzentration
AccuStart II GelTrack PCR SuperMix (2X)		10 µl	1x
Forward Primer (100mM)	5 '-cagcggtaagatccttgaga-3'	0,1µl	500 nM
Reverse Primer (100mM)	5 '-actccccgtcgltagataa-3'	0,1µl	500 nM
Nuclease-free water			7,8µl
Template (Phagenlysate)		2 µl	
Reaktionsvolumen (µl)			20µl

Tabelle 2 Primer und Bedingungen für PCR der getesteten Antibiotika Resistenzgene

Primer Name	Sequenz	Traget Gen	PCR Amplifikations - gröÙe	Anealing temp.(°C)
sul 1 - f	5' -tggtgacggtgttcggcanc3'	sul 1	790	63
sul 1 - r	5'-gcgaaggttccgagaagggtg-3'			
sul 2 -f	5'-gcgctcaaggcagatggcan-3'	sul 2	293	60
sul 2 - r	5'-gcgtttgataccggcaccctg-3'			
tet (A) -f	5" -gctacatcctgcttgtgccttc-3'	tet (A)	210	57
tet (A) -r	5'-catagatcgccgtgaagagg-3			
tet (B) -f	5'-ttggttcggggcaagltttg-3'	tet (B)	659	57
tet (B) -r	5 '-gtaaigggccaataacaccg-3'			
tet (C) -f	5 "-cttgagagccttcaaccag-3'	tet (C)	418	55
tet (C) -r	5 '-atggctgcatctacctgcc-3'			
OXA -f	5'-caagccaaaggcacgatagtlg-3'	bla OXA -2	561	56
OXA -r	5'-ctcaaccatcctaccacc-3'			
Bla Tem1 CMY2 -f	5 '-tggccgttgccgrtatctac-3'	bla CMY2	870	55
Bla Tem1 CMY2 -r	5'-cccgtttatgcacccatga-3'			
str A -f	5'-ccaatcgagatagaaggcaag-3'	strA	580	65
str A -r	5' -atcaactggcaggaggaacagg-3'			
aadA1 -f	5'-aacgacctttggaaacttcgg -3'	aadA1	352	60
aadA1 -r	5 '-ttcgctcatcgccagcccag-3'			
dfr1 -f	5'-gtgaaactatcactaatgg-3'	dfrA 1, dfrA5, dfrA 15, dfrA 15b, dfrA 16, dfrA 16b	474	55
dfr1 -r	5'-rtaaccrrttgcccagattt-3'			
dfr2 -f	5'-gatcgcggtgcgaagaaatc-3'	dfrB 1, dfrB 2, dfrB3	141	60
dfr2 -r	5'-aagcgagccacaggataaat-3'			
cmlA-f	5'-cgccgtcattcctcaccttc-3'	cmlA	214	54
cmlA-r	5'-gatcacggggccacgctgtgtc-3'	cmlA		

3.2.4.2 Agarose- Gelelektrophorese:

Herstellung eines 1%igen Agarosegels:

Hierfür wurden 1,8g Agarose (Sigma) einwogen und in 180ml 0,5 x TBE-Buffer gelöst. Die Suspension wurde unter Schwenken erhitzt, bis sich das Agarosepulver vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung eine Temperatur von 60°C erreicht hatte, wurden 10µl SYBR Safe® DNA gel stain *10,000 x concentrate in DMSO* pro 100ml Agarosegel hinzugefügt und geschwenkt. Das Gel wurde dann in die vorbereitete Gelkammer gegossen, wo es bis zur Aushärtung belassen wurde.

Durchführung

Die Elektrophoresekammer wurde mit 0,5 x TBE-Buffer befüllt und das Gel einlegt. Es wurde darauf geachtet, dass der Buffer die Oberfläche des Gels einige mm bedeckte. Danach wurden 10µl des amplifizierten PCR - Produkts mit 2µl Loading buffer (6x) versetzt.

Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1 % Agarose Gel für 1 Stunde bei 100 V. Anschließend wurden die Fragmente mittels UV-Licht auf einem UV-Transilluminator detektiert.

4. Ergebnisse

4.1 Induzierbare Phagen

Es wurden insgesamt je 50 Isolate von *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* auf induzierbare Phagen getestet. Dabei wurden die zuvor angezüchteten zu testenden Stämme mit H_2O_2 angereichert, um die darin enthaltenen Prophagen zu induzieren. Dieser Überstand wurde auf die mit dem Wirtstamm WT 14028s kultivierten Platten aufgetragen und somit die aktivierten Prophagen auf den Wirtstamm transduziert. Von den 50 *S. Typhimurium* Isolaten konnten bei 40 Isolaten Plaquebildungen nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Prozentsatz von 80.

Bei *S. Enteritidis* ließen sich bei 4 Isolaten Plaquebildungen nachweisen. Dies entspricht 8 % der untersuchten Isolate.



Abbildung 1 Plaquebildung bei der Probe des *S. Typhimurium* 157A

4.2 Antibiotikaresistenzgene

Das Gesamtlisat wurde auf vorhandene Antibiotikaresistenzgene mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese untersucht. Wie in Abb. 2 ersichtlich, wurde in die erste (hier die ganz linke) Geltasche der Marker gefüllt, die restlichen Taschen wurden mit den zu testenden Proben gefüllt.

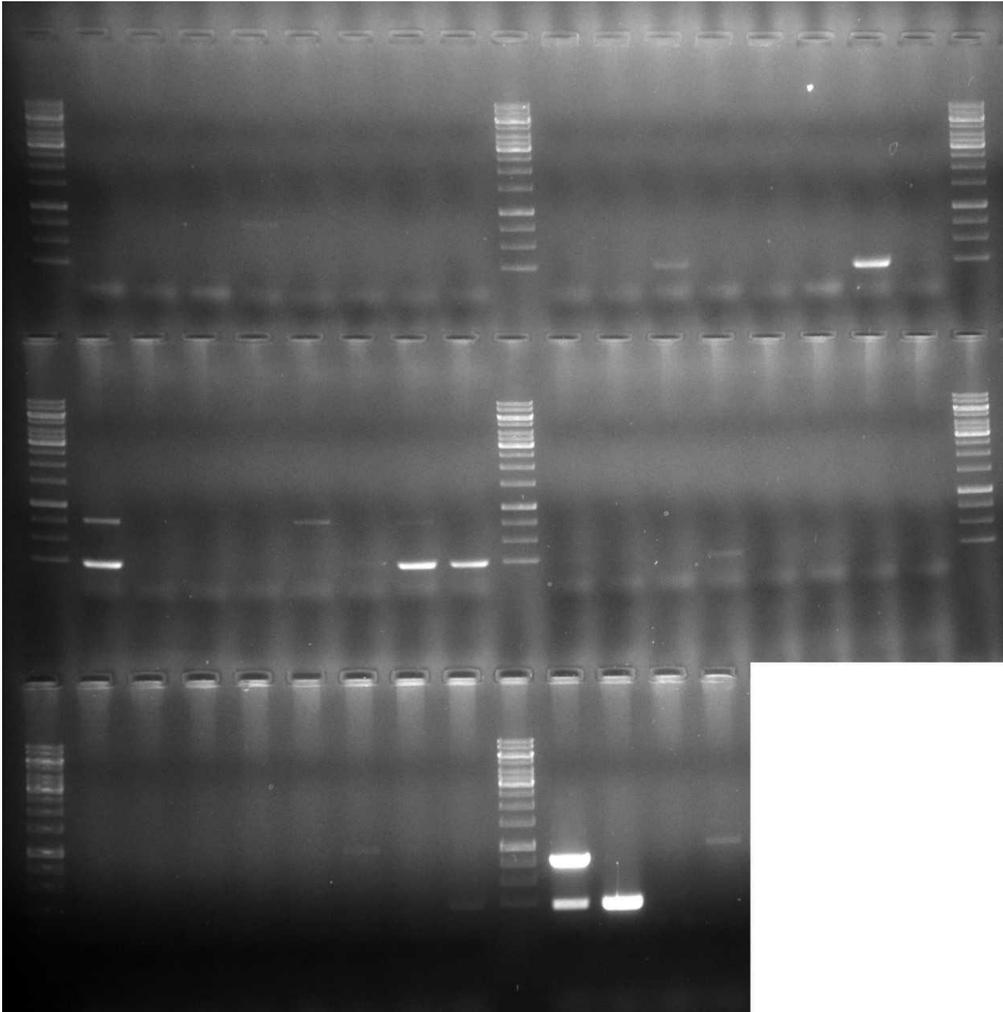


Abbildung 2 Gelelektrophorese: Durchführung einer Multiplex Gelelektrophorese für die Resistenzgene *sul1* und *sul2*

Probenauftragung von links nach rechts: Marker, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, PS7, PS8, PS9, Marker, PS11, PS13, PS14, PS15, PS16, PS17, PS19, PS20, Marker, PS21, PS22, PS23, PS24, PS25, PS26, PS27, PS28, Marker, PS30, PS31, PS32, PS33, PS35, PS36, PS37, PS38, Marker, PS43, PS44, PS45, PS46, PS47, PSL18B, PSL36B, PSL157, Marker, pos. K *sul1* und *sul2*, pos. K *sul2*, negativ Kontrolle: Wasser; negativ Kontrolle: ATCC14028WT

Dabei wurden die gewonnenen Phagenlysate auf Resistenzgene, die in Tab.3 angegebenen Antibiotika getestet.

Tabelle 3 Antibiotika und die zugehörigen Resistenzgene

Antibiotikum	Resistenzgen
Tetrazyclin	tet(A), tet(B), tet(C)
Sulfonamide	sul1/sul2
Ampicillin	bla TEM-1, bla OXA

Trimethoprim	dfr1,dfr2
Streptomycin	str-A-B
Streptomycin und Spectinomycin	aadA1
Cephamycin	cmy2
Chloramphenicol	cmlA

Bei keiner der vier aus *S. Enteritidis* gewonnenen Phagenlysate konnte das Vorhandensein der oben genannten Antibiotikaresistenzgene festgestellt werden.

Aus den von *S. Typhimurium* gewonnenen Phagenlysaten (n=40) konnten vier verschiedene, der oben genannten Resistenzgene nachgewiesen werden.

Am häufigsten ließ sich das Resistenzgen für Chloramphenicol (n=11) mit 22 % nachweisen, gefolgt von Sulfonamid sul2 (n=8) mit 16 % bzw. sul1 (n=5) mit 10 %. Weiters konnten noch Resistenzgene für Streptomycin (n=4) mit einem Vorkommen von 8 % und Ampicillin (n=1) mit 2 % nachgewiesen werden.

Tabelle 4 Vorkommen der Resistenzgene

Resistenzgene	Anzahl der positiv getesteten Proben von <i>S.Typhimurium</i>	Vorkommen in %
sul1	5	10
sul2	8	16
bla TEM-1	1	2
str-A-B	4	8
cmlA	11	22

4.3 Resistenzgene

In insgesamt 20 Lysaten von *S. Typhimurium* konnten Resistenzgene detektiert werden. Bei 9 Lysaten wurde das *cmlA*-Genfragment detektiert, bei 3 Lysaten das *sul2*-Genfragment, bei weiteren 3 Lysaten die Kombination der Genfragmente von *sul1*, *sul2* und *strA* gemeinsam und bei 2 Lysaten jeweils das *sul1*-Genfragment. In jeweils einem Lysat wurden die Kombination von *sul1*- und *cmlA*-Genfragmenten, *sul2*- und *bla_{TEM}*-Genfragmenten, *sul2*- und *strA*-Genfragmenten nachgewiesen. Lysate von *S. Enteritidis* enthielten keine Resistenzgene und auch keine Kombinationen von Resistenzgenen.

5. Diskussion

Antibiotikaresistente Salmonellen können sehr häufig in Nutztieren, auf Lebensmitteln und als Erreger der humanen Salmonellose identifiziert werden. Allerdings sind resistente Isolate nicht in allen Serovaren gleich häufig zu finden. Warum diese Variabilität besteht, könnte mit der Erkenntnis zur Bedeutung von Bakteriophagen in Bezug auf eine horizontale Übertragung von Erbinformation in Bakterien zusammenhängen. Insbesondere bei Salmonellen vom Serovar Typhimurium konnte gezeigt werden, dass Phagen einen wesentlichen Anteil an der Evolution dieser Bakterien besitzen. Bakteriophagen sind durch die spezifische wie auch durch eine generalisierte Transduktion in der Lage bakterielle Erbinformationen weiter zu geben.

In dieser Arbeit konnten von insgesamt 50 getesteten *S. Typhimurium* Isolaten aus 40 dieser Isolate Prophagen induziert werden. Bei *S. Enteritidis* lag die Anzahl der Salmonellen, die induzierbare Prophagen aufwiesen nur bei vier. Diese doch sehr unterschiedliche Anzahl an Isolaten, die aktivierbare Prophagen enthielten, wurde bereits in anderen Studien zum Vorkommen von Prophagen in Salmonellen beschrieben (Akhtar et al. 2014; Mahmoud et al. 2018). Dieser signifikante Unterschied zwischen den zwei Serovaren zeigt die wesentlich größere Bedeutung von Phagen für die Plastizität des Genoms im Serovar Typhimurium. Auch ein horizontaler Austausch von Antibiotikaresistenzen durch Phagen ist in diesem Serovar daher wahrscheinlicher. Wie sich in der durchgeführten Studie zeigte waren von diesen Gesamtlysaten pro Salmonellenisolat nur in denen aus *S. Typhimurium* gewonnenen Phagen Resistenzgene nachzuweisen. Resistenzgenfragmenten wurden in 50 % der als Gesamtlisat gewonnenen Phagen detektiert. Wobei am häufigsten das PCR-Fragment von *cmIA*, dessen Gen in Salmonellen für eine Chloramphenicolresistenz codiert, detektiert wurde (n=11, 55 %), obwohl Chloramphenicol heute in der Tiermedizin nicht mehr zum Einsatz kommt. Genfragmente von *sul1* und *sul2*, Gene, die für eine Sulfonamidresistenz codieren, wurden in 5 bzw. in 8 Lysaten nachgewiesen (25 % und 40 %). Eine Sulfonamidresistenz in *Salmonella* vom Serovar Typhimurium kommt relativ häufig vor und ist oftmals an andere Resistenzen gekoppelt, wie beim Phagentyp DT104 (Soo Jin Yang et al. 2001). Auch in dieser Studie wurden bei 6 Lysaten neben der *sul1* oder *sul2* positiven PCR auch noch weitere Antibiotikaresistenzgene mittels PCR nachgewiesen. Das Gen welches in *Salmonella* für eine Streptomycinresistenz verantwortlich zeichnet, *strA-B*, wurde in 8 % nachgewiesen. Diese, *strA-B* –Genfragmente lagen niemals ohne ein weiteres Antibiotikaresistenzgen vor, lagen also immer in Kombination mit anderen Genen in den untersuchten Lysaten vor. Ein Resistenzgen, das für eine β -Lactamresistenz zeichnet, *bla_{TEM}*, wurde nur in einem einzigen Lysat

vorgefunden zusammen mit einer *sul2* positiven PCR. Bei den aus *S. Enteritidis* gewonnenen Lysaten wurden keine der mittels PCR detektierten Resistenzgene nachgewiesen.

Die Ergebnisse der von *S. Typhimurium* gewonnenen Phagen könnten dafür sprechen, dass ein oder mehrere Phagen auch den sogenannten MDR Phagen zugerechnet werden können, die in der Lage sind diese Antibiotikaresistenzen horizontal zu übertragen, wie zum Beispiel DT 104 oder DT 193, da beide ein ähnliches Spektrum an Antibiotikaresistenzen aufweisen wie Studien von Chiu et al. und Gebreyes und Altier zeigen (Chiu et al. 2006, Gebreyes und Altier 2002).

Bei den in *S. Enteritidis* am häufigsten vorkommenden Phagen PT1 und PT4 konnte keine Korrelation zu Antibiotikaresistenzen gezogen werden, wodurch sich erklären lässt, dass im Zuge dieser Arbeit auch keine Resistenzgene in den Lysaten, gewonnen aus *S. Enteritidis*, gefunden wurden (Soo Jin Yang et al. 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Phagen für die horizontale Übertragung von Resistenzgenen, aber auch für die Plastizität des Genoms in *Salmonella* vom Serovar Typhimurium eminente Bedeutung besitzen. Die geringe Anzahl an aktivierbaren Prophagen im Serovar Enteritidis und auch der fehlende Nachweis von Resistenzgenen in diesen Lysaten, spricht für eine untergeordnete Bedeutung der horizontalen Übertragung von Antibiotikaresistenzgenen mittel Transduktion in diesem Serovar. Auch ist die geringe Anzahl an aktivierbaren Prophagen ein Zeichen dafür, dass die Plastizität des Genoms vom Serovar Enteritidis größtenteils nicht durch Phagen bedingt ist.

Hinsichtlich des Einsatzes von therapeutischen Phagen gegen *Salmonella* sollte vor allem bei dem Serovar *S. Typhimurium* größte Sorgfalt angewandt werden. Insbesondere was die Bildung von Mosaikphagen betrifft, die plötzlich von einem rein lytischen zu einem lysogenen Phagen mutieren können, wäre hier zu erwähnen und das diesbezügliche Risiko abzuwägen. Eine Übertragung von Antibiotikaresistenzen auf andere Salmonellen Vertreter wäre hier kontraproduktiv ebenso wie die Bildung von Kreuzresistenzen gegenüber rein lytischen Phagen.

Obwohl der Einsatz eines Phagencocktails gegen *S. Typhimurium* durch ein Forscherteam um Wall et al., in der Schweinehaltung das Salmonellaaufkommen, zu reduzieren vermochte und sich dieser Phagencocktail auch gegenüber einigen anderen Serovaren lytisch zeigte (Wall et al. 2010), bedarf eine breitflächige Anwendung unbedingt weiterer Studien zur Resistenzbildung gegenüber diesen Phagen, zur Bildung von Hybridphagen, zum Auftreten einer generalisierten Transduktion ebenso wie zu einer Verbreitung von Resistenz- und Virulenzgenen.

6. Zusammenfassung

Lange wurden Bakteriophagen für die Variation des genetischen Materials von Bakterien als bedeutungslos angesehen. Seit eine kostengünstige Ganzgenomsequenzierung von Bakterien in den letzten Jahren zu großflächigen Veröffentlichung von Sequenzierungsdaten geführt hat, wurde die Bedeutung von Phagen revidiert. In gewissen *Salmonella* Serovaren sind Phagen von eminenter Bedeutung für die Evolution und für eine schnelle Anpassung an unterschiedliche Umgebungssituationen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie häufig induzierbare Prophagen, die aus jeweils 50 Isolaten von *Salmonella* Serovar Enteritidis und Typhimurium gewonnen wurden, Antibiotikaresistenzgene enthielten. Aus den Isolaten des Serovars Typhimurium konnten aus 40 Isolaten (von 50) Phagen induziert werden und von diesen konnten in 20 der induzierbaren Phagenlysate Resistenzgene mittel PCR-Detektion nachgewiesen werden. Für den Serovar Enteritidis wurden nur aus vier der 50 Isolate Phagen gewonnen und in diesen konnten keine Resistenzgene nachgewiesen werden. Am häufigsten konnte *cmIA*, ein Gen, das in Salmonellen eine Chloramphenicolresistenz codiert, detektiert werden (55 %). Die Gene, die für eine Sulfonamidresistenz in *Salmonella* verantwortlich zeichnen, *sul I* und *sul II* konnten ebenfalls sehr häufig nachgewiesen werden (25% und 40%). Die Gene *bla_{TEM1}* und *strA-B* wurden ebenfalls in den Lysaten identifiziert. In sechs Lysaten wurden Kombinationen von verschiedenen Genen gefunden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Phagen für die horizontale Übertragung von Resistenzgenen in *Salmonella* vom Serovar Typhimurium große Bedeutung besitzen, allerdings für den Serovar Enteritidis von untergeordnetem Belang sind.

7. Abstract

Bacteriophages have long been thought to be of less importance for driving genetic variation in bacteria. This thought has been amended as genome sequencing became fast and cheap in the last years and many sequence data have been published. In certain *Salmonella* serovars phages have eminent importance for evolution and fast adaptation to environmental conditions. In this work we examined how often prophages can be induced in 50 isolates of *Salmonella* serovar Enteritidis and Typhimurium, each and how often they harboured antimicrobial resistance genes. From 40 (out of 50) isolates from serovar Typhimurium phages could be induced and in 20 of these lysates resistance genes could be detected by PCR. 50 Of the 50 isolates of serovar Enteritidis under study, only four harboured inducible phages and none of these hold resistance genes. Most often, the *cmIA* was detected, coding for chloramphenicol resistance in *Salmonella* (55 %). Genes, for sulfonamide resistance in *Salmonella*, *sul I* and *sul II* were seen frequently (25% und 40%), too. The *bla_{TEM1}* and *strA-B* gene fragments were detected in the lysates by PCR as well. In six lysates resistance gene combinations were detected. In here we showed that phages are important for horizontal transfer of resistance genes in *Salmonella* Typhimurium, but they are not equally important for serovar Enteritidis.

8. Literaturverzeichnis

- Akhtar M, Viazis S, Diez-Gonzalez F. 2014. Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against *Salmonella enterica* serovars. *Food Control*, 38:67–74.
- Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11(12):2970–2988.
- Brussaard CPD, Wilhelm SW, Thingstad F, Weinbauer MG, Bratbak G, Heldal M, Kimmance SA, Middelboe M, Nagasaki K, Paul JH, et al. 2008. Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruses. *The ISME Journal*, 2(6):575–578.
- Chaturongakul S, Ounjai P. 2014. Phage–host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann M-L, Brüssow H. 2004. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12):3677–3686.
- Chiu C-H, Su L-H, Chu C-H, Wang M-H, Yeh C-M, Weill F-X, Chu C. 2006. Detection of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Phage Types DT102, DT104, and U302 by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7):2354–2358.
- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology & Cell Biology*, 85(2):112–118.
- Díaz-Muñoz SL, Koskella B. 2014. Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. *Advances in Applied Microbiology*. 135–183, Elsevier;
- El-Sharkawy H, Tahoun A, El-Gohary AE-GA, El-Abasy M, El-Khayat F, Gillespie T, Kitade Y, Hafez HM, Neubauer H, El-Adawy H. 2017. Epidemiological, molecular characterization and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms in Egypt. *Gut Pathogens*, 9(1):8.

- Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, et al. 2017. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638):488–493.
- Fister S, Mester P, Witte AK, Sommer J, Schoder D, Rossmanith P. 2019. Part of the problem or the solution? Indiscriminate use of bacteriophages in the food industry can reduce their potential and impair growth-based detection methods. *Trends in Food Science & Technology*, 90:170–174.
- Gaidelytė A, Vaara M, Bamford DH. 2007. Bacteria, Phages and Septicemia. *PLoS ONE*, 2(11):e1145.
- Gebreyes WA, Altier C. 2002. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8):2813–2822.
- Ghoddusi A, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T, Akbarein H. 2019. Prevalence and characterization of multidrug resistance and variant *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella* isolates from cattle, poultry and humans in Iran. *Zoonoses and Public Health*, 66(6):587–596.
- Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2):e00066-18, /cmr/32/2/CMR.00066-18.atom.
- Haaber J, Leisner JJ, Cohn MT, Catalan-Moreno A, Nielsen JB, Westh H, Penadés JR, Ingmer H. 2016. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nature Communications*, 7(1):13333.
- Hobbs Z, Abedon ST. 2016. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with ‘Lytic or lysogenic’. *FEMS Microbiology Letters*, 363(7):fnw047.
- Housby JN, Mann NH. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14(11–12):536–540.

- Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J, Li J, Wang X. 2018a. Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, 111:631–641.
- Huang C, Shi J, Ma W, Li Z, Wang J, Li J, Wang X. 2018b. Isolation, characterization, and application of a novel specific Salmonella bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, 111:631–641.
- Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P. 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AI982185 for chicken IL-6 cDNA and AJ250838 for the partial chicken IL-6 genomic sequence, respectively. *Microbiology*, 146(12):3217–3226.
- Knodler LA, Effenbein JR. 2019. *Salmonella enterica*. *Trends in Microbiology*, 27(11):964–965.
- Kropinski, Andrew M et al. 2007. *Salmonella* phages and prophages--genomics and practical aspects. *Salmonella Methods and Protocols*. 133–175, Humana Press;
- Lettini AA, Saccardin C, Ramon E, Longo A, Cortini E, Dalla Pozza MC, Barco L, Guerra B, Luzzi I, Ricci A. 2014. Characterization of an unusual *Salmonella* phage type DT7a and report of a foodborne outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 189:11–17.
- Lucía Fernández, Susana Escobedo, Diana Gutiérrez, Silvia Portilla, Beatriz Martínez, Pilar García, Ana Rodríguez. 2017. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics*, 6(4):27.
- Mahmoud M, Askora A, Barakat AB, Rabie OE-F, Hassan SE. 2018a. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella*

- serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 266:8–13.
- Mahmoud M, Askora A, Barakat AB, Rabie OE-F, Hassan SE. 2018b. Isolation and characterization of polyvalent bacteriophages infecting multi drug resistant *Salmonella* serovars isolated from broilers in Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 266:8–13.
- Mahony J, Casey E, van Sinderen D. 2020. The Impact and Applications of Phages in the Food Industry and Agriculture. *Viruses*, 12(2):210.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, et al. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858):852–856.
- McDonnell B, Mahony J, Neve H, Hanemaaijer L, Noben J-P, Kouwen T, van Sinderen D. 2016. Identification and Analysis of a Novel Group of Bacteriophages Infecting the Lactic Acid Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17):5153–5165.
- Mohammed I. Nader, Marrib N.Rasheed, Hiba H.Hammed. 2015. Molecular Identification of *Salmonella typhimurium* from Chicken meat, and Human by PCR. International Institute of Chemical, Biological & Environmental Engineering June 5-6, 2015 Istanbul (Turkey). International Institute of Chemical, Biological & Environmental Engineering;
- Mølback M, Gerner-Smidt P, Wegener HC. 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 514–515.
- Ofir G. 2018. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. 11.
- Oh J-H, Park M-K. 2017. Recent Trends in *Salmonella* Outbreaks and Emerging Technology for Biocontrol of *Salmonella* Using Phages in Foods: A Review. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12):2075–2088.

- Olszak T, Latka A, Roszniowski B, Valvano MA, Drulis-Kawa Z. 2017. Phage Life Cycles Behind Bacterial Biodiversity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(36).
- Rabsch W. 2007. Salmonella typhimurium phage typing for pathogens. *Salmonella Methods and Protocols*. Humana Press, 177–211.
- Sevilla-Navarro S, Catalá-Gregori P, García C, Cortés 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. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68:101405.
- Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. 2012. Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*, 2012:1–13.
- Soo Jin Yang, Kyoung Yoon Park, Keun Seok Seo, Thomas E. Besser, Han Sang Yoo, Kyoung Min Noh, So Hyon Kim, Shuk Ho Kim, Bok Kwon Lee, Yoon Ho Kook, and Yong Ho Park 2001. Multidrug-resistant Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis identified by multiplex PCR from animals. *J. Vet. Sci* 2001 2(3): 181-188.
- Suttorp N, Mielke M, Kiehl W, Stück B. 2003. *Infektionskrankheiten: verstehen, erkennen, behandeln*. Georg Thieme Verlag.
- Threlfall EJ. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2):141–148.
- Wahl A, Battesti A, Ansaldi M. 2019. Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host? *Molecular Microbiology*, 111(2):303–316.
- Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD. 2010. Phage Therapy To Reduce Preprocessing Salmonella Infections in Market-Weight Swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1):48–53.
- Young R, Gill JJ. 2015. Phage therapy redux — What is to be done? 3.

9. Anhang

Tabelle 5 - Ergebnisse der Prophagen Induktion und Prophagen Sterilfiltration von *S. Typhimurium*

Salmonella Typhimurium Stamm	Prophagen Induktion	Prophagen Sterilfiltrieren
1	23.10.2019	28.11.2019
2	23.10.2019	28.11.2019
3	23.10.2019	28.11.2019
4	23.10.2019	28.11.2019
5	23.10.2019	28.11.2019
6	23.10.2019	keine Prophagen
7	26.11.2019	27.11.2019
8	26.11.2019	27.11.2019
9	26.11.2019	27.11.2019
10	26.11.2019	keine Prophagen
11	26.11.2019	27.11.2019
13	06.11.2019	28.11.2019
14	06.11.2019	28.11.2019
15	06.11.2019	28.11.2019
16	06.11.2019	28.11.2019
17	06.11.2019	21.11.2019
18	06.11.2019	keine Prophagen
19	06.11.2019	28.11.2019
20	06.11.2019	28.11.2019
21	06.11.2019	28.11.2019
22	06.11.2019	28.11.2019
23	06.11.2019	28.11.2019
24	06.11.2019	21.11.2019
25	06.11.2019	28.11.2019
26	26.11.2019	27.11.2019
27	26.11.2019	27.11.2019
28	26.11.2019	27.11.2019
29	26.11.2019	keine Prophagen
30	26.11.2019	27.11.2019
31	26.11.2019	27.11.2019
32	26.11.2019	27.11.2019
33	26.11.2019	27.11.2019
34	26.11.2019	keine Prophagen
35	26.11.2019	27.11.2019
36	26.11.2019	27.11.2019

37	26.11.2019	27.11.2019
38	26.11.2019	27.11.2019
39	26.11.2019	keine Prophagen
40	26.11.2019	keine Prophagen
41	26.11.2019	keine Prophagen
42	26.11.2019	keine Prophagen
43	26.11.2019	27.11.2019
44	26.11.2019	27.11.2019
45	26.11.2019	27.11.2019
46	26.11.2019	27.11.2019
47	26.11.2019	27.11.2019
FS47	23.10.2019	keine Prophagen
L18B	23.10.2019	28.11.2019
L36B	23.10.2019	28.11.2019
s157	23.10.2019	28.11.2019

Tabelle 6 - Ergebnisse der Prophagen Induktion und Prophagen Sterilfiltration von *S. Enteritidis*

Salmonella Enteritidis Stamm	Prophagen Induktion	Prophagen Sterilfiltrieren
FS4A	29.11.2019	keine Prophagen
FS5	29.11.2019	keine Prophagen
FS10	29.11.2019	keine Prophagen
FS15	29.11.2019	keine Prophagen
FS19	29.11.2019	keine Prophagen
FS27B	29.11.2019	keine Prophagen
FS30	29.11.2019	keine Prophagen
FS34	29.11.2019	keine Prophagen
FS51	29.11.2019	keine Prophagen
FS52	29.11.2019	keine Prophagen
FS55	29.11.2019	keine Prophagen
FS60	29.11.2019	keine Prophagen
FS63	29.11.2019	keine Prophagen
FS69	29.11.2019	keine Prophagen
FS83	29.11.2019	keine Prophagen
FS91	29.11.2019	keine Prophagen
FS101	29.11.2019	keine Prophagen
WS27A	29.11.2019	keine Prophagen
WS27D	29.11.2019	31.01.2020
WS30A	29.11.2019	keine Prophagen
WS30B	29.11.2019	31.01.2020
WS47	29.11.2019	keine Prophagen
S7	29.11.2019	31.01.2020
S18	29.11.2019	31.01.2020
E4	04.12.2019	keine Prophagen
E5	04.12.2019	keine Prophagen
E6	04.12.2019	keine Prophagen
E7	04.12.2019	keine Prophagen
E8	04.12.2019	keine Prophagen
E9	04.12.2019	keine Prophagen
E10	04.12.2019	keine Prophagen
E11	04.12.2019	keine Prophagen
E12	04.12.2019	keine Prophagen
E13	04.12.2019	keine Prophagen
E14	04.12.2019	keine Prophagen
E15	04.12.2019	keine Prophagen
E16	04.12.2019	keine Prophagen

E17	04.12.2019	keine Prophagen
E18	04.12.2019	keine Prophagen
E19	04.12.2019	keine Prophagen
E20	04.12.2019	keine Prophagen
E21	04.12.2019	keine Prophagen
E22	04.12.2019	keine Prophagen
E23	04.12.2019	keine Prophagen
E24	04.12.2019	keine Prophagen
E25	04.12.2019	keine Prophagen
E26	04.12.2019	keine Prophagen
E27	04.12.2019	keine Prophagen
E28	04.12.2019	keine Prophagen
E29	04.12.2019	keine Prophagen
E30	04.12.2019	keine Prophagen

Tabelle 7 - PCR Ergebnisse der aus *S. Typhimurium* gewonnenen Lysate

Phagenlysat	PCR sul1	PCR sul2	PCR tet A/B/C	PCR OXA	PCR bla TEM-1	PCR CMY2	PCR strA	PCR aadA1	PCR dfr1	PCR dfr2	PCR cmlA	Phagenlysat
PS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS1
PS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS2
PS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS3
PS4	Sul1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS4
PS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS5
PS7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS7
PS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS8
PS9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS9
PS11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS11
PS13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS13
PS14	-	Sul2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS14
PS15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS15
PS16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS16
PS17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS17
PS19	-	Sul2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS19
PS20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS20
PS21	Sul1	Sul2	-	-	-	-	strA	-	-	-	-	PS21
PS22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS22
PS23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS23
PS24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS24
PS25	Sul1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS25
PS26	-	Sul2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS26
PS27	Sul1	Sul2	-	-	-	-	strA	-	-	-	-	PS27
PS28	-	Sul2	-	-	-	-	strA	-	-	-	-	PS28
PS30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS30
PS31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS31
PS32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS32
PS33	-	Sul2	-	-	-	-	strA	-	-	-	-	PS33
PS35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS35
PS36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS36
PS37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS37
PS38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS38
PS43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS43
PS44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PS44
PS45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS45
PS46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS46
PS47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PS47
PSL18B	Sul1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PSL18B

PSL36B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cmlA	PSL36B
PSs157	-	Sul2	-	-	bla TEM-1	-	-	-	-	-	-	PSs157

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Plaquebildung bei der Probe des S.Typhimurium 157A.....	18
Abbildung 2 Gelelektrophorese: Durchführung einer Multiplex Gelelektrophorese für die Resistenzgene sul1 und sul2 Probenauftragung von links nach rechts: Marker, PS1, PS2, PS3, PS4 ,PS5, PS7, PS8, PS9, Marker, PS11, PS13 PS14, PS15, PS16, PS17, PS19, PS20, Marker, PS21, PS22, PS23, PS24, PS25, PS26, PS27, PS28,Marker PS30, PS31,PS32, PS33, PS35, PS36, PS37, PS38, Marker, PS43, PS44, PS45,PS46,PS47, PSL18B, PSL36B, PSs157, Marker, pos. K sul1 und sul2, pos. K sul2,negativ Kontrolle: Wasser; negativ Kontrolle: ATCC14028WT	19

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 verwendete Reaktionskomponenten und ihre Volumina.....	15
Tabelle 2 Primer und Bedingungen für PCR der getesteten Antibiotika Resistenzgene	16
Tabelle 3 Antibiotika und die zugehörigen Resistengene	19
Tabelle 4 Vorkommen der Resistenzgene	20
Tabelle 5 - Ergebnisse der Prophagen Induktion und Prophagen Sterilfiltration von S. Typhimurium.....	30
Tabelle 6 - Ergebnisse der Prophagen Induktion und Prophagen Sterilfiltration von S. Enteritidis.....	32
Tabelle 7 - PCR Ergebnisse der aus S. Thyphimurium gewonnenen Lysate.....	34
Tabelle 8 - PCR Ergebnisse des aus S. Enteritidis gewonnenen Lysate	36