

6. ZUSAMMENFASSUNG

Isolate der *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovaren Choleraesuis, Hadar und Enteritidis besitzen weltweit eine große veterinärmedizinische, zoonotische und lebensmittelhygienische Bedeutung. Mit den bislang zur Verfügung stehenden klassischen mikrobiologischen Verfahren war eine exakte und sichere Identifizierung einzelner Isolate innerhalb dieser Serovaren zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge nicht oder nur in begrenztem Maße möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene voneinander unabhängige molekularbiologische Verfahren hinsichtlich ihrer Eignung zur Typisierung von epidemiologisch nicht verwandten Isolatentypen der *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) Serovaren Choleraesuis, Hadar und Enteritidis mit dem Ziel der Erstellung beziehungsweise Verbesserung molekularer Typisierungssysteme überprüft und anschließend an praktischen Beispielen im Rahmen von Untersuchungen zur Differenzierung von zwei *S. Choleraesuis*-Lebendimpfstämmen und elf *S. Enteritidis*-Lebendimpfstammkandidaten von Feldisolaten derselben Serovar sowie einer populationsgenetischen Untersuchung an *S. Hadar*-Isolaten eines Geflügelbestandes erprobt. Zur Anwendung kamen folgende molekularbiologische Verfahren: Plasmidanalysen, Ribotyping, IS200-Typing, Makrorestriktionsanalysen mit verschiedenen Restriktionsenzymen sowie für Isolate der Serovar Enteritidis zusätzlich RAPD-PCR-Analysen. Die Differenzierungskraft der einzelnen Verfahren für Isolate der verschiedenen Serovaren wurde durch Berechnung der diskriminatorischen Indizes bestimmt und bewertet.

Folgende Ergebnisse wurden für die untersuchten *Salmonella*-Serovaren erzielt:

1. Alle 26 in die Untersuchung einbezogenen *S. Choleraesuis*-Feldisolate waren im Besitz eines 52 kbp großen Virulenzplasmids, sie wiesen jedoch keine IS200-Elemente auf. Mit Ribotyping konnten drei eng verwandte Hybridisierungsmuster ermittelt werden. Nach Makrorestriktion war die Unterscheidung von zehn *Xba*I-Typen, 13 *Spe*I-Typen, acht *Nor*I-Typen und 13 *Sfi*I-Typen möglich. Ein Höchstmaß an Differenzierung wurde durch Kombination von Plasmidanalyse und Makrorestriktionsanalyse erzielt. Zur Differenzierung des **Suisaloral[®]-Impfstammes** von den Feldisolaten eigneten sich die Plasmidprofilanalyse und die *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse, während die Abgrenzung des **Impfstammes SC-54[®]** lediglich durch die Plasmidprofilanalyse gelang.

2. Die 34 untersuchten, epidemiologisch nicht verwandten *S. Hadar*-Isolate wiesen 19 verschiedene Plasmidprofile auf, zeigten aber im Ribotyping das gleiche Hybridisierungsmuster und verfügten über keine IS200-Elemente. Die Plasmidprofilanalyse erwies sich als Einzelmethode mit der höchsten Differenzierungskraft, gefolgt von *BlnI*-Makrorestriktionsanalyse und *SpeI*-Makrorestriktionsanalyse. Durch die Kombination der Ergebnisse von Makrorestriktionsanalyse und Plasmidanalyse konnte eine maximale Unterscheidung erzielt werden. Die Anwendung dieser Verfahren bei 41 *S. Hadar*-Isolaten einer Geflügelherde führte zur Identifizierung einer Vielzahl genomisch unterschiedlicher Isolate im Verlaufe eines 15monatigen Zeitraumes.
3. Von den 54 *S. Enteritidis*-Feldisolaten waren 87 % im Besitz von Virulenzplasmiden der Größen 55, 60 oder 95 kbp. Beim Ribotyping wurde lediglich bei einem Isolat ein abweichendes Muster entdeckt, während mittels IS200-Typing drei unterschiedliche Muster gefunden wurden. Nach Makrorestriktion mit *XbaI*, *SpeI* und *NotI* wurden neun, zwölf bzw. sechs unterschiedliche Typen differenziert. Die RAPD-PCR ergab schlechte oder keine Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen den untersuchten Isolaten. Die größte Differenzierungskraft besaß die Kombination der Ergebnisse der Makrorestriktion mit denen der Plasmidanalyse. Eine Subtypisierung von Isolaten gleichen Phagentyps war sowohl mit der Plasmidanalyse als auch mit der Makrorestriktionsanalyse möglich. Zur Identifizierung der *S. Enteritidis*-Lebendimpfstammkandidaten eignete sich das Makrorestriktionsenzym *NotI*. Mit diesem Enzym konnten alle Impfstoffkandidaten von den Feldisolaten unterschieden werden. Mit *XbaI* und *SpeI* war je eine der elf Mutanten von allen anderen Isolaten zu unterscheiden.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß Plasmidanalysen und Makrorestriktionsanalysen die wichtigsten Komponenten der erstmals erstellten molekularbiologischen Typisierungssysteme für *S. Choleraesuis*- und *S. Hadar*-Isolate, aber auch des Typisierungssystems für *S. Enteritidis*-Isolate darstellen. Die Anwendung dieser molekularbiologischen Verfahren ermöglicht nicht nur eine weitgehende Differenzierung zwischen epidemiologisch nicht verwandten Feldisolaten der entsprechenden Serovaren, sondern leistet auch einen wesentlichen Beitrag zur Identifizierung von *Salmonella*-Lebendimpfstämmen und Lebendimpfstammkandidaten sowie zur Überwachung ihrer genomischen Stabilität.

6.1 SUMMARY

Martina Weide-Botjes:

Characterization of isolates of the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Choleraesuis, Hadar and Enteritidis by using molecular methods.

Isolates of the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) serovars Choleraesuis, Hadar and Enteritidis are of major importance worldwide as causative agents of infections in domestic animals and man. So far, the exact and reliable identification of single isolates of these three serovars was strongly limited by the low discriminatory capacities of classic microbiological typing methods. Thus, several independent molecular typing methods were used in this study to evaluate their discriminatory power for the differentiation of epidemiologically unrelated isolates of each of the three serovars Choleraesuis, Hadar and Enteritidis in order to implement molecular typing systems for *S. Choleraesuis* and *S. Hadar*, but also with regard to the improvement of a pre-existing typing system for *S. Enteritidis*. Furthermore, these methods were applied to differentiate two *S. Choleraesuis* live vaccine strains and eleven *S. Enteritidis* live vaccine candidates from field isolates of these two serovars. Moreover, the genomic relationships among *S. Hadar* isolates obtained from the same poultry flock were analyzed by using molecular typing methods. The following molecular methods were used in this study: plasmid analysis, ribotyping, IS200 typing and macrorestriction analysis with different restriction endonucleases. *S. Enteritidis* isolates were also subjected to RAPD-PCR analysis. The discriminatory power of the different typing methods for isolates of the three serovars was determined and evaluated by calculation of the discriminatory indices.

The following results were obtained:

1. All 26 *S. Choleraesuis* field isolates carried a 52 kbp virulence plasmid and did not harbour IS200 elements. Three closely related ribotyping patterns were observed. Macrorestriction analysis with *Xba*I or *Not*I yielded ten or eight different fragment patterns, respectively. *Spe*I and *Sfi*I macrorestriction analysis each resulted in 13 different fragment patterns. Maximum differentiation was obtained from the combination of the

- results of plasmid analysis and macrorestriction analysis. The **Suisaloral[®] live vaccine strain** showed a unique plasmid profile and a unique *Xba*I macrorestriction pattern while the **SC-54[®] live vaccine strain** differed from all other *S. Choleraesuis* isolates only by its plasmid profile.
2. The 34 epidemiologically unrelated ***S. Hadar* isolates** showed 19 different plasmid profiles, but the same ribotyping pattern. No IS200 elements were detectable. Plasmid analysis proved to be the most discriminatory single method, followed by *Bln*I and *Spe*I macrorestriction analysis. Maximum differentiation resulted from the combination of plasmid analysis and macrorestriction analysis. The application of these methods for the analysis of 41 *S. Hadar* isolates from the same poultry flock obtained during a 15 month period led to the identification of a variety of genotypically different isolates.
 3. Of the 54 ***S. Enteritidis* field isolates** included in this study, 87 % carried virulence plasmids of either 55, 60, or 95 kbp. Only one isolate differed from the others by its ribotyping pattern. Three different IS200 hybridization patterns were observed. Macrorestriction analysis using the enzymes *Xba*I, *Spe*I, or *Not*I resulted in 9, 12, or 6 different fragment patterns, respectively. Depending on the primer used, RAPD-PCR analysis yielded only poor or even no differentiation between the *S. Enteritidis* isolates. Again, the combination of plasmid analysis and macrorestriction analysis proved to be the most discriminatory set of methods. Both methods were suitable for subtyping of *S. Enteritidis* isolates of the same phage type. *Not*I macrorestriction analysis proved to be the method of choice for the differentiation of all eleven **vaccine candidates** from the *S. Enteritidis* field isolates.

The data presented in this study confirmed that plasmid analysis and macrorestriction analysis represent most valuable components of the newly described molecular typing systems for *S. Choleraesuis* and *S. Hadar* isolates, but also of the typing system for *S. Enteritidis* isolates. The use of these techniques not only allowed the exact and reliable differentiation of epidemiologically unrelated field isolates of the three serovars, it also enlarged the spectrum of methods for the identification of *Salmonella* live vaccine strains or live vaccine candidates as well as for monitoring their genomic stability.