

Untersuchungen zur Effektivität von Bakteriophagen unter
Praxisbedingungen im Rahmen von Minimierungsstrategien
von *Campylobacter* beim Broiler

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von
Sophie Kittler
aus Bremen

Hannover 2014

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2014

© 2014 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-208-7

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchungen zur Effektivität von Bakteriophagen unter Praxisbedingungen im
Rahmen von Minimierungsstrategien von *Campylobacter* beim Broiler

INAUGURAL-DISSERTATION Zur

Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

-Doctor medicinae veterinariae-

(Dr. med. vet.)

Vorgelegt von

Sophie Kittler

aus Bremen

Hannover 2014

Wissenschaftliche Betreuung: 1. Univ. Prof. Dr. med. vet. Günter Klein
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
2. PD Dr. med. vet. Gerhard Glünder
Klinik für Geflügel

1. Gutachter: 1. Univ. Prof. Dr. med. vet. Günter Klein
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
2. PD Dr. med. vet. Gerhard Glünder
Klinik für Geflügel

2. Gutachterin: Apl. Prof. Dr. med. vet. Beatrice Grummer
Hannover Graduate School for Veterinary
Pathobiology, Neuroinfectiology and
Translational Medicine (HGNI)

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014

Diese Arbeit wurde durch Mittel von Lohmann Animal Health GmbH und der N-Bank gefördert.

Für Eva und Frieder

Publikationsverzeichnis

Zur Dissertation gehörige Publikationen

Dieser Dissertation liegen zwei Publikationen zugrunde.

Der erste Fachartikel befasst sich mit der erstmaligen Anwendung eines Bakteriophagencocktails zur Reduktion von *Campylobacter* in kommerziellen Broilermastbetrieben.

Der zweite Fachartikel beschäftigt sich mit den Fragen, die die Populationsdynamik von *Campylobacter* während der Anwendung eines Phagencocktails betreffen.

Fachartikel 1:

KITTLER, S., S. FISCHER, A. ABDULMAWJOOD, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2013):
Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks.
Appl Environ Microbiol 79 (23), 7525-7533

Fachartikel 2:

KITTLER, S., S. FISCHER, A. ABDULMAWJOOD, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2014):
Colonisation of a phage susceptible *Campylobacter jejuni* population in two phage positive broiler flocks.
PLoS ONE 9: doi:10.1371/journal.pone.0094782.

Weitere Publikationen, Poster und Vorträge

Diese Dissertation wurde im Rahmen des Projektes „Komplementärer Einsatz der Phagen- und Impfstofftechnologie zur Reduzierung von *Campylobacter* und *Salmonella* im Geflügel“ erstellt. In diesem Projekt entstanden u.a. folgende weitere Publikationen:

Fachartikel

HIRSCH, K. (2010):

Development of strategies for minimizing *Campylobacter* in poultry by utilizing bacteriophages.

Dissertation an der TiHo Hannover, Hannover

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013):

Microplate-Test for the Rapid Determination of Bacteriophage-Susceptibility of *Campylobacter* Isolates- Development and Validation.

PLoS ONE 8 doi:10.1371/journal.pone.0053899.

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013):

Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance.

PLoS ONE 8 doi: 10.1371/journal.pone.0078543.

Poster

KITTLER, S., S. FISCHER, V. ATANASSOVA, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2011):
Efficacy of a *Campylobacter* specific bacteriophage- cocktail for reduction of *Campylobacter* spp. in broiler flocks.

In: International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter*, and Related Organisms 28.-31.08.2011, Vancouver, Canada, 41

KITTLER, S., S. FISCHER, V. ATANASSOVA, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2011):
Wirksamkeit von *Campylobacter*-spezifischen Bakteriophagen zur Minimierung von *Campylobacter* spp. in Broilerbeständen.

In: DVG, Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene 27. 9.- 30.9. 2011 Garmisch-Patenkirchen, Germany, 114

KITTLER, S., S. FISCHER, V. ATANASSOVA, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2012):
Anwendung eines Bakteriophagencocktails in Hähnchenmastbetrieben zur Reduktion von *Campylobacter* spp.

In: DVG, Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen, Germany, 126

KITTLER, S., S. FISCHER, V. ATANASSOVA, D. WINDHORST, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2012):

Field trials to test the application of a bacteriophage-cocktail in broiler farms to reduce *Campylobacter* spp.

In: Viruses of Microbes, Brussels, Belgium, 241

KITTLER, S., S. FISCHER, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2012):

Vergleich der Anwendung eines Phagencocktails gegenüber der Applikation von Einzelphagen zur Reduktion von *Campylobacter* spp. in Hähnchenmastbetrieben.

In: DVG , Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Patenkirchen, Germany, 126

KITTLER, S., S. FISCHER, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2012):

Versuche zur Anwendung eines Bakteriophagencocktails in Hähnchenmastbetrieben zur Reduktion von *Campylobacter* spp.

In: Dialog, "Arbeiten im Spannungsfeld zwischen eingefordertem Tierwohl und vorausgesetzter Lebensmittelsicherheit", Hannover, Germany, 21

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2012):

Schnell-Test zum Nachweis Bakteriophagen-resistenter *Campylobacter*-Isolate. Zentrumstag des Zentrums für Infektionsmedizin der TiHo Hannover, Hannover

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2012):

Einsatz von Bakteriophagen zur Reduzierung von *Campylobacter* in der Broilermast. Zentrumstag des Zentrums für Infektionsmedizin der TiHo Hannover, Hannover

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013):

The potential of phage therapy to reduce *Campylobacter* colonization in broilers under consideration of bacterial resistance.

Zentrumstag des Zentrums für Infektionsmedizin der TiHo Hannover, Hannover

KITTLER, S., S. FISCHER, D. WINDHORST, D. TARAS, G. GLÜNDER, G. KLEIN (2013):

Field trials to test the application of a bacteriophage-cocktail in broiler farms to reduce *Campylobacter* spp.

CHRO 17th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Aberdeen

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013):

The potential of phage therapy to reduce *Campylobacter* colonization in broilers under consideration of bacterial resistance.

CHRO 17th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Aberdeen

WINDHORST, D., S. KITTLER, D. TARAS, G. KLEIN, S. FISCHER u. G. GLÜNDER (2013): Field trials to test the application of a bacteriophage cocktail in broiler farms to reduce *Campylobacter* spp.

In: VAAM, Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM), Bremen, Germany, 58

Vorträge

KITTLER, S. (2011):

Entwicklung komplementärer Minimierungsstrategien für *Campylobacter* im Geflügel durch die Anwendung von Bakteriophagen

1. Zwischenbericht Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Hannover

KITTLER, S. (2011):

Entwicklung komplementärer Minimierungsstrategien für *Campylobacter* im Geflügel durch die Anwendung von Bakteriophagen

2. Zwischenbericht Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Hannover

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013):

Untersuchungen zur *Campylobacter*-Reduktion beim Broiler durch den Einsatz von Phagen und zum Einfluss der bakteriellen Phagen-Abwehr über die Dauer einer Mastperiode.

83. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten, Hannover

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	4
Inhaltsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis.....	11
Abkürzungsverzeichnis.....	12
1. Einleitung	13
2. Publikationen	17
2.1. Effect of bacteriophage application on <i>Campylobacter jejuni</i> loads in commercial broiler flocks.....	17
2.2. Colonisation of a phage susceptible <i>Campylobacter jejuni</i> population in two phage positive broiler flocks	19
3. Zusammenfassung der Ergebnisse	21
3.1. Auswahl der Bakteriophagen	21
3.2. <i>In-vivo</i> -Vorversuch.....	21
3.3. Herstellung des Phagen-Cocktails.....	22
3.4. Feldversuche	22
3.4.1. Phagenapplikation	22
3.4.2. Phagen-Dosis.....	23
3.4.3. Bakteriophagen-Konzentration	23
3.4.4. <i>Campylobacter</i> -Konzentration	24
3.5. Untersuchungen zur Populationsdynamik von <i>Campylobacter</i> in Feldversuch 3.....	25
3.5.1. <i>Campylobacter</i> -Biotypen	25
3.5.2. <i>Campylobacter</i> -Sequenz-Typen	26
3.5.3. Phagen-Empfänglichkeit, GGT-Aktivität und Motilität.....	26

4.	Übergreifende Diskussion	29
4.1.	<i>In-vivo</i> -Vorversuch.....	29
4.2.	Herstellung der Phagen-Suspension für die Feldversuche	30
4.3.	Auswahl der Ställe und Zeitpunkt der Applikation	32
4.4.	Feldversuche	34
4.4.1.	Bakteriophagen-Dosis in den Feldversuchen	34
4.4.2.	Bakteriophagen-Konzentration	36
4.4.3.	<i>Campylobacter</i> -Konzentration	40
4.5.	Populationsdynamik von <i>Campylobacter</i> nach der Phagen- applikation.....	42
4.5.1.	Sequenz-Typen und Biotypen	42
4.5.2.	Phagen-Empfänglichkeit der <i>Campylobacter</i> -Isolate	43
4.5.3.	Kolonisationsfaktoren und Phagen-Empfänglichkeit	45
4.6.	Ausblick	47
5.	Zusammenfassung	51
6.	Summary	54
7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Anhang	65
	Danksagung	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Campylobacter</i> -Nachweis im Vorversuch und in den Feldversuchen an unterschiedlichen Tagen nach der Phagenapplikation	65
Tabelle 2 Bakteriophagen-Nachweis im Vorversuch und in den Feldversuchen an unterschiedlichen Tagen nach der Phagenapplikation	67
Tabelle 3 Anzahl der Isolate aus den einzelnen Feldversuchen (FV), die weiterführend untersucht wurden.....	68
Tabelle 4 Ergebnisse der MLST-Analyse	69
Tabelle 5 Ergebnisse der Biotypisierung	70
Tabelle 6 Ergebnisse aus den weiterführenden Untersuchungen; Isolate aus Feldversuch 3 zusammengefasst nach Proben	71

Abkürzungsverzeichnis

C.	<i>Campylobacter</i>
d.p.a.	days post application, Tage nach der Phagenapplikation
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EU	Europäische Union
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika
g	Gramm
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GRAS	Generally recognized as safe, Unbedenklichkeitsbezeichnung der FDA für Lebensmittelzusatzstoffe
KbE	Koloniebildende Einheiten
LT	Lebenstag
log ₁₀	dekadischer Logarithmus
ml	Milliliter
MLST	Multilocus sequence typing
NCTC	National Collection of Type Cultures
P	Signifikanz
PbE	Plauebildende Einheiten
spp.	Spezies

1. Einleitung

Die vorliegende Dissertation untersucht erstmalig den Einsatz von Bakteriophagen zur Reduktion von *Campylobacter* spp. in der Primärproduktion. Die humane Campylobacteriose ist die am häufigsten gemeldete lebensmittelbedingte Erkrankung in der EU (EFSA 2013). Die vor allem über Hähnchenfleisch übertragene Zoonose wird hauptsächlich durch die Bakterienspezies *Campylobacter (C.) jejuni* und *C. coli* hervorgerufen (CRUSHELL et al. 2004). *C. jejuni* und *C. coli* sind im Hähnchen symptomlose Kommensalen des Darmes (HERMANS et al. 2012). Sie gelangen am Schlachtband, vor allem bei der Ausweidung, auf den Schlachtkörper. Bei Verzehr, Zubereitung und Handhabung des kontaminierten Hähnchenfleisches sowie durch direkten und indirekten Kontakt mit Geflügel werden sie auf den Menschen übertragen (EFSA 2010). Sie können beim Menschen neben wässrigem und blutigem Durchfall schwere Folgeerkrankungen wie Guillain-Barré-Syndrom, Reaktive Arthritis und Miller-Fischer-Syndrom hervorrufen (NACHAMKIN et al. 1998). In Deutschland haben Maßnahmen in den Tierbeständen andere lebensmittelbedingte Zoonosen bereits erfolgreich eingedämmt (WICHMANN-SCHAUER et al. 2009). Ein Beispiel dafür ist, dass eine verschärfte Biosecurity in deutschen Geflügelbeständen den Eintrag der humanpathogenen *Salmonella* Serovare Enteritidis und Typhimurium fast vollständig verhindern konnte. Die ersten Schritte sind bei diesem Vorgehen das Festlegen von Zielwerten für die Bekämpfungsprogramme und von Überwachungsstrategien zur Verifizierung des Erfolges (WICHMANN-SCHAUER et al. 2009). Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) diskutiert für *Campylobacter* die Einführung von Grenzwerten, anders als bei Salmonellen, bei denen eine Freiheit der Bestände verlangt wird. Bisher mangelt es jedoch an wirksamen Strategien zur Einhaltung dieser Ziele (EFSA 2011). Eine viel diskutierte Methode ist die Applikation von Bakteriophagen in der Primärproduktion (EFSA 2011). Bakteriophagen sind Viren, die spezifisch Bakterienstämme oder –spezies infizieren und zu einer Zerstörung der Bakterienzelle führen. Mehrere Veröffentlichungen bestätigen die Wirksamkeit dieser

Methode zur Reduktion von *Campylobacter in vivo* (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010). Die bisher durchgeführten *in-vivo*-Versuche fanden unter kontrollierten experimentellen Bedingungen statt. Zur Wirkung und den Problemen unter Praxisbedingungen lagen bisher keine Daten vor (CONNERTON et al. 2011). Zudem variieren Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen im zeitlichen Ablauf und dem Maß der Reduktion.

Ziel dieser Dissertation war es,

- (1) erstmalig Feldversuche zur Reduktion von *Campylobacter* durch Bakteriophagen durchzuführen, mit denen der Grundstein für ein in der Praxis nutzbares Anwendungskonzept gelegt wird.

Dies beinhaltet folgende Fragestellungen:

- Können *Campylobacter*-Bakteriophagen in ausreichender Menge produziert werden?
- Können sie über das in der Praxis übliche Dosierungssystem appliziert werden?
- Entspricht die *Campylobacter*-Reduktion im Feldversuch den Ergebnissen bisheriger experimenteller Studien? Wenn nicht, welche zusätzlichen Faktoren beeinflussen die Ergebnisse in Feldversuchen?
- Entspricht die Resistenzbildung in Feldversuchen derjenigen, die in anderen Studien unter experimentellen Bedingungen aufgetreten ist?

- (2) aus den gewonnenen Ergebnissen Empfehlungen für die Anwendung von Bakteriophagen in der Praxis zu entwickeln und das bisher unter experimentellen Bedingungen entwickelte Konzept erstmals an die Gegebenheiten in der Praxis anzupassen.

Dies beinhaltet insbesondere folgende Fragen:

- Welches ist die optimale Zusammensetzung eines Bakteriophagen-Cocktails?
- Wann ist der optimale Zeitpunkt für die Dosierung?
- Welches ist die optimale Dosis?

Eine vorhergehende Dissertation wählte vier *in vitro* gut charakterisierter *Campylobacter*-Bakteriophagen aus, die bisher zur Typisierung von *Campylobacter* genutzt wurden (HIRSCH 2010). Der in der vorliegenden Dissertation genutzte Cocktail bestand zu gleichen Teilen aus diesen vier Bakteriophagen. In einem *in-vivo*-Laborversuch (KITTLER et al. unveröffentlichte Daten) und in drei Feldversuchen wurde die Effektivität getestet (KITTLER et al. 2013). Wie in bisherigen Studien variierten zeitliche Ausprägung und Stärke der Reduktion. Um Empfehlungen für eine maximale *Campylobacter*-Reduktion zum Zeitpunkt der Schlachtung geben zu können, untersuchten wir die Ursachen dieser Unterschiede beispielhaft in einem der Feldversuche: Es traten unterschiedliche *Campylobacter*-Populationen in den Ställen auf, die sich in ihren Kolonisationseigenschaften unterschieden (KITTLER et al. 2014).

2. Publikationen

2.1. Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks

Published in *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79, No. 23, 2013, pages 7525-7533

Sophie Kittler¹, Samuel Fischer², Amir Abdulmawjood¹, Gerhard Glünder², Günter Klein^{1*}

1 Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

2 Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover, Bünteweg 17, D-30559 Hannover, Germany

Keywords: *Campylobacter*, bacteriophages, field trial, control measure

DOI Number: 10.1128/AEM.02703-13

<http://aem.asm.org/content/79/23/7525.long>

*corresponding author:

Günter Klein, email address: Günter.Klein@tiho-hannover.de

Anteil der Erstautorin an der Arbeit:

Versuchsplanung, Entwicklung einer Methode zur Herstellung der Bakteriophagen für die Applikation, Herstellung des Bakteriophagen- Cocktails, Phagenapplikation und Probennahme, Bearbeitung der Proben, Erstellung und Auswertung der Ergebnisse, Abfassung des Manuskripts.

2.2. Colonisation of a phage susceptible *Campylobacter jejuni* population in two phage positive broiler flocks

Published in PLoS ONE, 2014, accepted

Sophie Kittler¹, Samuel Fischer², Amir Abdulmawjood¹, Gerhard Glünder², Günter Klein^{1*}

1 Institute for Food Quality and Food Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany

2 Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover, Bünteweg 17, D-30559 Hannover, Germany

Keywords: *Campylobacter*, bacteriophages, field trial, control measure

DOI Number: 10.1371/journal.pone.0094782

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0094782>

*corresponding author:

Günter Klein, email address: Günter.Klein@tiho-hannover.de

Anteil der Erstautorin an der Arbeit:

Versuchsplanung, Durchführung der Versuche, Erstellung und Auswertung der Ergebnisse, Abfassung des Manuskripts.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1. Auswahl der Bakteriophagen

Die vorliegende Dissertation untersucht erstmals die Effektivität eines unter Praxisbedingungen verabreichten Phagen-Cocktails. Eine vorhergehende Dissertation wählte vier *Campylobacter*-spezifische Bakteriophagen anhand ihrer Wirkung für einen Cocktail aus (HIRSCH 2010). Diese Typ-III-Bakteriophagen NCTC 12672, 12673, 12674 und 12678 zeigten *in vitro* ein breites Wirtsspektrum (HIRSCH 2010). Sie gehören zu den 16 NCTC-Bakteriophagen des britischen Phagen-Typisierung-Schemas.

3.2. *In-vivo*-Vorversuch

Ein Vorversuch unter experimentellen Bedingungen bestätigte die Wirksamkeit *in vivo* vor der Durchführung der Feldversuche (KITTLER et. al. unveröffentlichte Daten). Der Versuch wurde nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover beim Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 33.9-42502-05-11A115 angezeigt. Es wurden zwei Gruppen mit jeweils 70 Masthähnchen in der Klinik für Geflügel der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover getrennt eingestallt. Die Tiere bekamen den *Campylobacter*-Feldstamm 1472-06 oral verabreicht. Drei Tage später wurde *Campylobacter* in den Tieren nachgewiesen und jedem Tier wurde der Phagen-Cocktail in einer Dosis von $\log_{10} 7,5$ PbE/Tier in den Kropf appliziert. Vier Wochen lang wurde der Blinddarminhalt regelmäßig auf *Campylobacter* untersucht. In der Versuchsgruppe trat drei Tage nach der Phagenapplikation eine Reduktion von 1,7 KbE/g Blinddarminhalt im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Diese hielt bis 21 Tage nach der Applikation der Phagen an (KITTLER et al. unveröffentlichte Daten).

3.3. Herstellung des Phagen-Cocktails

Im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit wurde anschließend eine Methode zur Herstellung von Phagen-Suspension für die Feldversuche in entsprechenden Mengen entwickelt. Hierzu wurden unterschiedliche Flüssigmedien und Ausgangskonzentrationen für die Vermehrung von Bakteriophagen untersucht. Die Herstellung in Standard-I-Bouillon mit 100 ml *Campylobacter*-Suspension (McFarland 3) und einer Bakteriophagen-Ausgangskonzentration von \log_{10} 5,3 PbE/ml stellte sich als optimal heraus (KITTLER et al. unveröffentlichte Daten). Die bei dieser Vorgehensweise ohne weitere Konzentrierung maximal erreichbare Dosis für die Feldversuche betrug \log_{10} 7,5 PbE/Tier.

3.4. Feldversuche

Die Feldversuche wurden gemäß der geltenden Gesetzeslage sowie gemäß Tierschutzbestimmungen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Die applizierten Bakteriophagen wurden als Futtermittelzusatzstoffe durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit unter dem Aktenzeichen 41.3-63003-13/2011 für die Versuche zugelassen.

3.4.1. Phagenapplikation

Es fanden drei Feldversuche statt. Feldversuch 1 und 2 fanden auf derselben Broilerfarm statt, während Feldversuch 3 auf einer anderen durchgeführt wurde. Jeder Feldversuch umfasste zwei *Campylobacter*-positive Ställe, von denen einer als Kontrollgruppe ohne Phagenapplikation verblieb, während in dem anderen als Versuchsstall über das Tränkewasser der Phagencocktail verabreicht wurde. Der Cocktail wurde in allen Versuchsgruppen zwischen dem 31. und 36. Lebenstag (LT) verabreicht. Die Applikation erfolgte jeweils unmittelbar nach dem ersten Nachweis

von *Campylobacter* in beiden Ställen. Die einzelnen Versuchsabläufe sind in Tabelle 2 der ersten Publikation dargestellt.

3.4.2. Phagen-Dosis

Die angestrebte Dosis betrug in allen Ställen \log_{10} 7,5 PbE/Tier und war im Rahmen des Herstellungsprozesses die höchstmögliche Konzentration. Es wurden Untersuchungen zur Kontrolle der Phagen-Konzentration und der tatsächlich von den Tieren aufgenommen Phagendosis durchgeführt. Dafür wurde die Phagen-Suspension nach dem Transport zur Farm sowie das Tränkewasser während der Dosierung quantitativ auf Phagen untersucht. Aus den Ergebnissen der Tränkewasserproben wurde eine hier als tatsächliche Dosis bezeichnete aufgenommene Phagenmenge pro Tier berechnet. Die Untersuchung der tatsächlichen Dosis pro Tier im Tränkewasser ergab für Feldversuch 1 \log_{10} 7,5 PbE, für Feldversuch 2 \log_{10} 5,8 PbE und für Feldversuch 3 \log_{10} 7,6 PbE. Die tatsächliche Dosis von \log_{10} 5,8 PbE/Tier in Feldversuch 2 lag deutlich unter der aus Messungen direkt nach dem Transport ermittelten Dosis von \log_{10} 7,9 PbE/Tier. In den beiden anderen Versuchen stimmten die aus Messungen nach dem Transport und im Tränkewasser kalkulierten Dosen etwa überein (Feldversuch 1 \log_{10} 7,2 PbE/Tier, Feldversuch 3 \log_{10} 7,5 PbE/Tier) (Publikation 1).

3.4.3. Bakteriophagen-Konzentration

Nach der Phagenapplikation wurden Proben quantitativ auf Bakteriophagen und *Campylobacter* untersucht. Es handelte sich um frische Kotproben, die, wie in der ersten Veröffentlichung beschrieben, einen Tag nach der Phagenapplikation sowie in regelmäßigen Abständen bis zur Schlachtung in den Ställen genommen wurden. Bei der Schlachtung wurden Blinddarmproben vom Schlachtband genommen und der Inhalt wurde quantitativ auf Bakteriophagen und *Campylobacter* untersucht. In den Proben der Kontrollgruppen von Feldversuch 1 und 2 wurden keine Bakteriophagen nachgewiesen (Nachweisgrenze 50 PbE/g Probenmaterial). In der Kontrollgruppe

von Feldversuch 3 wurden, vier Tage nach Applikation in der Versuchsgruppe, Phagen nachgewiesen. Die nachgewiesene Konzentration entsprach der Phagen-Konzentration in der Versuchsgruppe. In der Versuchsgruppe des ersten Feldversuchs traten nur in den Blinddarmproben sechs Tage nach der Applikation Phagen auf. Im zweiten Versuch wurden Phagen bei einzelnen Proben einen Tag nach Applikation nachgewiesen sowie zwei einzelne Plaques bei einer Probe vier Tage nach der Applikation. Im dritten Versuch stieg die Phagen-Konzentration in der Versuchsgruppe im Verlauf des Versuches bis über $\log_{10} 5$ PbE/g Probenmaterial an. Auch in der Kontrollgruppe traten Bakteriophagen in steigender Konzentration auf (Publikation 1: Abbildung 1).

3.4.4. *Campylobacter*-Konzentration

Die *Campylobacter*-Konzentrationen variierten bei Versuchsbeginn erheblich sowohl zwischen den drei Feldversuchen als auch zwischen den Gruppen innerhalb eines Versuchs. In allen Feldversuchen stieg jedoch in den Kontrollgruppen die Konzentration von *Campylobacter* kontinuierlich bis mindestens zu einer Konzentration von $\log_{10} 5$ KbE/g Probenmaterial. In den Versuchsgruppen aller drei Feldversuche wurde eine Unterbrechung des Konzentrationsanstiegs ein bis vier Tage nach der Phagenapplikation beobachtet. Der Unterschied zur *Campylobacter*-Konzentration der Kontrollgruppe war jedoch nur im ersten Feldversuch signifikant. Im späteren Verlauf der Feldversuche kam es in den Versuchsgruppen nach dem zwischenzeitlichen Abfall zu einem erneuten Anstieg der *Campylobacter*-Konzentration. Im dritten Feldversuch war die Kontrollgruppe mit Bakteriophagen kontaminiert. Drei Tage nach dem ersten Phagennachweis in der Kontrollgruppe sank die *Campylobacter*-Konzentration in der Kontrollgruppe auf eine im Vergleich zur Versuchsgruppe signifikant geringere Konzentration (Publikation 1: Abbildung 1).

3.5. Untersuchungen zur Populationsdynamik von *Campylobacter* in Feldversuch 3

3.5.1. *Campylobacter*-Biotypen

In allen Versuchen wurde der Biotyp repräsentativer, nach dem Zufallsprinzip ausgewählter Isolate mittels ApiCampy bestimmt. ApiCampy ist ein standardisiertes System zur Identifizierung von *Campylobacter*. Die Isolate werden zur Identifizierung in 11 Mikroröhrchen mit unterschiedlichen dehydrierten Substraten bebrütet. Es entstehen Stoffwechselprodukte, die spontan oder nach Zugabe von Reagenzien zu Farbumschlägen führen. Außerdem werden die Isolate zur Überprüfung von Assimilations- oder Inhibitionsreaktionen mit neun unterschiedlichen Substraten und Antibiotika bebrütet. Kann das jeweilige Isolat das Substrat verwerten oder ist es gegenüber den entsprechenden Antibiotika resistent, kommt es zu einer Trübung. Die Reaktionen werden in eine Softwaremaske eingegeben und anhand einer entsprechenden Datenbasis identifiziert. Neben der Speziesidentifizierung können Phänotypen mit unterschiedlichen Reaktionsmustern voneinander abgegrenzt werden. Für *C. jejuni* sind dies die Biotypen 1-3. Insgesamt wurden 412 *Campylobacter*-Isolate mittels ApiCampy untersucht. Alle untersuchten Isolate gehörten der Spezies *C. jejuni* an. In allen Feldversuchen traten Isolate des Biotyps 1 und des Biotyps 2 auf. Die Ergebnisse der 412 untersuchten Isolate erlaubten eine Aussage über die Häufigkeit der Biotypen im Verlauf der Versuche. Im ersten Feldversuch traten keine drastischen Verschiebungen in der Häufigkeit der Biotypen auf. Im zweiten Versuch kam es einen Tag nach Phagenapplikation zu einem drastischen Anstieg der Häufigkeit von Biotyp 1. Im dritten Versuch dagegen kam es nach Applikation bzw. Einschleppung von Phagen in beiden Gruppen zu einem Anstieg von Biotyp 2 (Publikation 1: Abbildung 2).

3.5.2. *Campylobacter*-Sequenz-Typen

Zusätzlich wurden ausgewählte Isolate per MLST-Analyse auf ihren Sequenz-Typ (ST) und auf die Phagen-Empfänglichkeit geprüft. Multilocus sequence typing (MLST) ist eine molekularbiologische Technik, die die Sequenzierung einzelner, konstitutiver Gene zur Identifizierung von Mikroorganismen nutzt. Man vervielfältigt und sequenziert die Genabschnitte dieser so genannten Housekeeping-Gene. Die jeweilige Sequenz wird einem bestimmten Allel zugeordnet. Die Allele aller Housekeeping-Gene ordnen das untersuchte Isolat dem Allelprofil eines bestimmten Sequenz-Typen (ST) zu. Typen mit mehr als fünf übereinstimmenden Allelen bilden einen klonalen Komplex (CC) (LANGEN 2008). Die in dieser Studie genutzte MLST-Analyse für *Campylobacter* nutzt die sieben Housekeeping-Gene *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* und *uncA*. Die Größe der Abschnitte liegt zwischen 402 und 507 Basenpaare (DINGLE et al. 2001). Eine MLST-Analyse wurde mit 25 *Campylobacter*-Isolaten aus den Feldversuchen durchgeführt. Im ersten Feldversuch trat bei allen untersuchten Isolaten der gleiche ST auf. Dagegen kamen im zweiten und dritten Versuch jeweils zwei STs vor, von denen der ST 6836 in der PubMLST-Datenbank vorher nicht bekannt war. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der ersten Publikation in Tabelle 3 in der zweiten Publikation in Tabelle 2 dargestellt.

3.5.3. Phagen-Empfänglichkeit, GGT-Aktivität und Motilität

Bei der Untersuchung einzelner *Campylobacter*-Isolate auf ihre Phagen-Empfänglichkeit fiel auf, dass Isolate aus Feldversuch 3, die dem Biotyp 1 angehörten keine Phagen-Empfänglichkeit zeigten, wogegen Biotyp 2 Isolate empfänglich waren (Publikation 1: Tabelle 3). Bei den STs konnte keine Korrelation mit einem bestimmten Biotyp oder der Phagen-Empfänglichkeit festgestellt werden (Publikation 1: Tabelle 3). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Verschiebungen in der Verteilung der Biotypen, wurden weitere *Campylobacter*-Isolate des dritten Feldversuchs genauer untersucht. Dafür wurden während der Durchführung des Versuches *Campylobacter*-Isolate aus den Proben gewonnen. Es wurde pro Stall

und Untersuchungszeitpunkt eine Anzahl von 100 Isolaten angestrebt, um insgesamt 800 Isolate zu untersuchen. Nicht von allen Probennahmen konnten 100 Isolate gewonnen werden, so dass insgesamt 668 Isolate aus dem 3. Versuch weiterführend untersucht wurden. Die Phagen-Empfänglichkeit und GGT-Aktivität sowie die Motilität wurden analysiert.

Für die Empfänglichkeits-Tests wurden *Campylobacter* und Bakteriophagen in verflüssigtem NZCYM-Agar gemischt und auf eine Agarplatte ausgebracht. Durch anschließendes Bebrüten bildete sich ein dünner *Campylobacter*-Rasen. Die Anzahl erfolgreicher Phagen-Infektionen konnte an der Zahl der Plaques abgelesen werden. Plaques sind klare Lysezonen im Bakterienrasen. Sie bilden sich durch die Diffusion freigesetzter Bakteriophagen und die Infektion benachbarter Bakterienzellen mit finaler Zellyse. Es wurde eine Standard-Suspension von \log_{10} 4 PbE/ml verwendet. Die Phagen-Empfänglichkeit wurde in vier Stufen eingeteilt: unempfindliche *Campylobacter*-Isolate ohne Plaquebildung, voll empfindliche Isolate mit einer zum Kontrollstamm NCTC 12662 vergleichbaren Plaquebildung und eine um eine bzw. zwei Zehnerpotenzen reduzierte Plaquebildung (mittlere bzw. niedrige Empfänglichkeit). Insgesamt wiesen 60,5% aller Isolate in Feldversuch 3 volle Phagen-Empfänglichkeit auf. Nur 10,5% aller Isolate wiesen eine reduzierte Phagen-Empfänglichkeit auf und 29% waren unempfindlich.

Für die Messung der GGT-Aktivität wurde eine Suspension des *Campylobacter*-Isolates in einer Mikrowell-Platte angefertigt und mit dem Substrat Gamma-Glutamyl- β -Naphthylamid gemischt. Nach vierstündiger Inkubation färbte sich die Lösung unter Zugabe von GGT-Aminopeptidase-Reagenz rot, wenn eine GGT-Aktivität des Isolates vorlag. Die 668 Isolate bildeten zwei Gruppen. Bei 482 Isolaten wurde GGT-Aktivität nachgewiesen. Bei 186 Isolaten konnte in diesem Test keine GGT-Aktivität nachgewiesen werden.

Bei allen 668 *Campylobacter*-Isolaten wurde außerdem die Motilität bestimmt. Dazu wurde 1 μ l einer Suspension des Isolates auf eine Agarplatte mit verringertem Agargehalt aufgetropft. Nachdem die Platte über Nacht bebrütet worden war, konnte das Schwärmverhalten anhand des Durchmessers des Bakterienrasens bestimmt

werden. Isolate ohne GGT-Aktivität zeigten eine signifikant niedrigere Motilität als Isolate, die GGT-Aktivität aufwiesen. Dabei korrelierte die GGT-Aktivität der 668 Isolate signifikant mit der Phagen-Empfänglichkeit (Publikation 2: Tabelle 4). Auch Isolate, die unempfindlich für Phagen waren, wiesen eine signifikant verringerte Motilität im Vergleich zu allen empfänglichen Isolaten auf.

4. Übergreifende Diskussion

4.1. *In-vivo*-Vorversuch

Ziel des Vorversuches war es, den durch Hirsch (HIRSCH 2010) *in vitro* ausgewählten Bakteriophagen-Cocktail auf seine Wirksamkeit *in vivo* zu testen. In anderen Studien mit Bakteriophagen wurde auf einen möglichen Unterschied zwischen der Wirkung *in vivo* und *in vitro* hingewiesen (ATTERBURY et al. 2005; LOC CARRILLO et al. 2005). Die Wirkung dieses Cocktails wurde jedoch durch die eigenen Untersuchungen bestätigt. Schon drei Tage nach der Applikation zeigte sich in dem Vorversuch eine signifikante Reduktion der *Campylobacter*-Konzentration um 1,7 KbE/g Blinddarminhalt. Andere Studien mit *Campylobacter*-spezifischen Bakteriophagen hatten zu ähnlichen Zeitpunkten eine Reduktion beobachtet (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010). Während der Zeitpunkt der Reduktion in diesen Studien etwa mit den eigenen Ergebnissen übereinstimmen hatten andere Untersuchungen erst vier oder sieben Tage nach Phagenapplikation, also ein bis drei Tage später als in unserem Versuch, einen signifikanten Effekt detektiert (LOC CARRILLO et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; FISCHER et al. 2013).

Die Dynamik der Reduktion ist stark stamm-, dosis- und wirtsabhängig (KITTLER et al. 2013). Die Phagenstämme und die Dosis der Phagenapplikation sind die zwei wichtigsten Parameter für eine effektive Anwendung (GOODRIDGE u. ABEDON 2003). Das Andauern der signifikanten *Campylobacter*-Reduktion über einen Zeitraum von 21 Tagen stimmt weitgehend mit den Ergebnissen anderer Studien überein. In einigen Studien stieg die *Campylobacter*-Konzentration allerdings nach einer kurzzeitigen Reduktion von bis zu \log_{10} 5,6 PbE/g Blinddarminhalt (LOC CARRILLO et al. 2005) erneut deutlich an (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005). Dieser Effekt trat in unserem Versuch erst wesentlich später auf. Ein geringer Unterschied von ca. \log_{10} 1 PbE/g Blinddarminhalt zwischen

der *Campylobacter*-Konzentration in der Versuchs- und Kontrollgruppe hielt in einer anderen Studie bis zu 38 Tage an (WAGENAAR et al. 2005). In unserem *In-vivo*-Vorversuch zeigte sich 21 Tage nach Phagenapplikation noch eine Reduktion um \log_{10} 2,4 KBE/g Blinddarminhalt verglichen mit der Kontrollgruppe. Fischer et al. (FISCHER et al. 2013) verwendeten den durch Hirsch (HIRSCH 2010) ausgewählten Bakteriophagen-Cocktail in zwei *In-vivo*-Versuchen mit einem anderen *Campylobacter*-Feldstamm. Der Versuchsaufbau entsprach unserem Vorversuch. Eine signifikante Reduktion zeigte sich bei Fischer et al. ein bis drei Tage, bzw. (bei einem zweiten Versuch mit gleichem Studiendesign) sieben Tage nach der Applikation, wobei im zweiten Fall die Reduktion über 28 Tage anhielt (FISCHER et al. 2013).

Der genaue Schlachtermin steht in der Geflügelmast oft erst wenige Tage vor der Schlachtung fest. Daher würde nur eine langfristige Reduktion die maximale Wirkung am Schlachttag sicherstellen. Die oben beschriebenen Ergebnisse unterstreichen, welche Bedeutung unterschiedliche Wirtsbakterien für die Ausprägung der Reduktion haben. In anderen *In-vivo*-Studien zur Wirkung von *Campylobacter*-Bakteriophagen waren Beginn und Dauer der *Campylobacter*-Reduktion sehr unterschiedlich (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010). Die genauen Hintergründe und Auswirkungen auf die Reduktion bedürfen weiterer Untersuchung. Die Daten unseres Vorversuches geben Hinweise für die Planung der Feldversuche. Auf dieser Grundlage fand die erste Probennahme in den Feldversuchen bereits 24h nach der Applikation statt.

4.2. Herstellung der Phagen-Suspension für die Feldversuche

Die Herstellung von Bakteriophagen für die Bekämpfung lebensmittelassoziierter Zoonosen in der Primärproduktion sollte eine Dosis zum Ziel haben, die einen deutlichen Effekt auf die Bakterienpopulation hat (GOODRIDGE u. ABEDON 2003). Da in der Regel nicht beliebig große Volumina verabreicht werden können, muss die Konzentration in der hergestellten Suspension entsprechend hoch sein. Methoden

zum Aufreinigen und Aufkonzentrieren von Bakteriophagen sind zwar für einige Phagen verfügbar, jedoch bisher aufwendig, kostenintensiv und für *Campylobacter*-spezifische Bakteriophagen nicht etabliert (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Bisher ist in der Literatur keine Methode zur Produktion großer Phagenmengen für *Campylobacter*-spezifische Bakteriophagen beschrieben (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Standardisierte industrielle Prozesse für die Phagenproduktion liegen bisher nicht vor (GOODRIDGE u. BISHA 2011). Für die vorliegende Studie wurde daher erstmals eine Methode entwickelt, die die Herstellung einer ausreichenden Dosis ohne zusätzliches Aufkonzentrieren ermöglicht.

Der Vorgang der Phagenproduktion erfolgt allgemein in drei Schritten: (1) Beimpfen eines Nährmediums mit dem Wirtsbakterium und Zugabe von Phagen; (2) Bebrüten; (3) Aufreinigen durch entfernen der Bakterien mittels Zentrifugieren und Mikrofiltrieren (CARLSON 2005). Für *Campylobacter*-spezifische Bakteriophagen gibt es Methoden für die Vermehrung in flüssigem und auf festem Nährmedium (HIRSCH 2010). Bei festen Medien kommt als zusätzlicher Schritt nach dem Bebrüten das Abschwemmen der Phagen mit dem Bakterienrasen hinzu (HIRSCH 2010). Da dieser Zwischenschritt für jede Agarplatte einzeln erfolgen muss, ist die Herstellung größerer Phagenmengen nur in flüssigem Medium praktikabel. In der vorliegenden Studie entwickelten die Autoren erstmals eine Methode mit 5L-Chargen für *Campylobacter*-spezifischer Bakteriophagen. In einigen Chargen traten maximale Konzentrationen von bis zu \log_{10} 8,66 PbE/ml auf. Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben anderer Methoden in der Literatur (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Es bestanden jedoch erhebliche Schwankungen bei der Produktion, sowohl zwischen einzelnen Chargen als auch zwischen den unterschiedlichen Phagenstämmen (Standardabweichung aller Chargen \log_{10} 1,06 PbE/ml). Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Der applizierte Cocktail sollte zu gleichen Teilen aus den vier verwendeten Phagen bestehen und in allen Feldversuchen die gleiche Dosis pro Tier aufweisen. Daher legten wir die Dosis für die Feldversuche auf \log_{10} 7,5 PbE/Tier fest, dies entsprach der Dosis des Vorversuches.

4.3. Auswahl der Ställe und Zeitpunkt der Applikation

Bisherige experimentelle Studien untersuchten unterschiedliche Applikationswege, Phagenstämme sowie Applikationsdosen um die *Campylobacter*-Konzentration in Broilern zu reduzieren. Eine Dosis von $\log_{10} 7$ PbE/Tier führte in allen Versuchen zu einer signifikanten Reduktion von *C. jejuni*, wobei die Ergebnisse zeitlich und quantitativ variierten (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010; FISCHER et al. 2013). Drei Reviews zur Reduktion von *Campylobacter* kommen zu dem Schluss, dass Versuche mit natürlich infizierten, kommerziellen Broilern der nächste Schritt zur Weiterentwicklung der Phagenanwendung sein müssen (NEWELL et al. 2008; CONNERTON et al. 2011; JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Ziel der Versuchsplanung für die Feldversuche war einerseits, die Phagenapplikation an Praxisbedingungen anzupassen, andererseits sollten die Ergebnisse der Feldversuche mit bisherigen Studien, dem Vorversuch und vor allem untereinander vergleichbar sein.

Für die Feldversuche wurden pro Versuch zwei *Campylobacter*-positive Ställe ausgewählt, in denen die Tiere gleich alt waren. Weitere Kriterien waren, dass sich beide Ställe eines Versuchs auf einem Betriebsgelände befanden und von derselben Person betreut wurden. In Versuch 1 und 3 gelang es außerdem, Ställe der gleichen Bauart und Tierzahl auszuwählen. In Versuch 2 entsprachen sich Belüftungstechnik sowie Fütterungs- und Tränketechnik beider Ställe, die Tierzahl im Kontrollstall war jedoch höher (Tabelle 1 Veröffentlichung 1). Dies ist die erste Studie, die eine Applikation über das Tränkewasser testet, wie sie in der kommerziellen Hähnchenhaltung für Arzneimittel und Futtermittelzusatzstoffe üblich ist (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010; FISCHER et al. 2013).

Die zeitlichen Rahmenbedingungen für Feldversuche in Hähnchenmastbetrieben sind eng. Die Infektion mit *Campylobacter* erfolgt häufig erst ab dem 21. Masttag (VAN GERWE et al. 2009) und breitet sich innerhalb von wenigen Tagen über die gesamte Herde aus (EVANS u. SAYERS 2000). Die mittlere Mastdauer in

Deutschland betrug 2009 allerdings nur 35,6 Tage (DAMME 2010) und der Schlachttag steht oft erst wenige Tage vor der Schlachtung fest. In den vorliegenden Feldversuchen wurde frühestens am 27. Lebenstag *Campylobacter* in den Hähnchenmastbetrieben nachgewiesen. Der Eintrag von *Campylobacter* erfolgt in kommerziellen Mastbetrieben vor allem über andere Tiere, Personal und das Vorgreifen (NEWELL et al. 2011). Letzteres findet um den 30. Masttag statt; 20-30% der Tiere werden geschlachtet (Zielgewicht 1500- 1600g). Die verbliebenen Tiere werden wenig später mit einem höheren Mastgewicht von etwa 2000g verarbeitet (BERK 2010). Der *Campylobacter*-Nachweis in Feldversuch 1 erfolgte nach dem Vorgreifen.

Die Phagenapplikation erfolgte in allen bisherigen *In-vivo*-Versuchen erst nach der vollständigen Ausbreitung von *Campylobacter* in den Tiergruppen. Auch der *Campylobacter*-Stamm war in allen bisherigen Studien vorher bekannt und auf seine Empfänglichkeit für die Infektion mit den applizierten Bakteriophagen getestet worden (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010; FISCHER et al. 2013). Die Reduktion von *Campylobacter* wird insbesondere von der Phagen-Empfänglichkeit und dem Applikationszeitpunkt beeinflusst (CONNERTON et al. 2011). Für die Testung der Phagen-Empfänglichkeit muss *Campylobacter* aus dem Betrieb kulturell isoliert werden. Daher dauert diese Untersuchung mindestens 4 Tage (Bebrütungsdauer *Campylobacter* 48h, einmaliges Überimpfen einer Bakterienkolonie und Übernachtkultur, Testen der Phagen-Empfänglichkeit mit 24h Bebrütungsdauer). Die Phagen-Empfänglichkeit vor der Applikation zu testen birgt das Risiko, dass die Tiere bereits geschlachtet sind, bevor der Cocktail zusammengestellt wurde. Die Applikation der Phagen in den Versuchsställen der Feldversuche erfolgte daher direkt, ohne Untersuchung der *Campylobacter* auf ihre Phagen-Empfänglichkeit, einen Tag nach dem Nachweis von *Campylobacter*. Der Schlachtzeitpunkt lag 6 bis 7 Tage nach der Phagenapplikation (Publikation 1: Tabelle 2). In den bisherigen Studien war eine Applikation 2-3 Tage vor der Schlachtung empfohlen worden (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Die Untersuchung der *Campylobacter*- und

Bakteriophagen-Konzentration über 6 bis 7 erlaubte eine Evaluation dieser Empfehlung.

4.4. Feldversuche

4.4.1. Bakteriophagen-Dosis in den Feldversuchen

Ziel der Feldversuche war es, eine geeignete Bakteriophagen-Konzentration für die Reduktion von *Campylobacter* im Tier zu erreichen. Für alle Feldversuche produzierten wir eine Dosis von \log_{10} 7,5 PbE/Tier. Dies ergab sich aus den Ergebnissen vorhergehender Versuche und aus der Produktion ohne Aufkonzentrierung (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Loc Carrillo et al. (LOC CARRILLO et al. 2005) hatten in *In-vivo*-Versuchen Dosierungen von \log_{10} 3, 7 und 9 PbE/Tier getestet. Eine Dosis von \log_{10} 7 führte zu der stärksten *Campylobacter*-Reduktion. Alle bisherigen Studien nutzten Dosen von \log_{10} 5-11 PbE/Tier (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2009; CARVALHO et al. 2010). Auch die Reduktion des im Vorfeld der Feldversuche durchgeführten *In-vivo*-Versuches bestätigt die Wirksamkeit der Dosis von \log_{10} 7,5 PbE/Tier.

In den vorliegenden Feldversuchen erfolgte die Applikation der Bakteriophagen erstmals über ein konventionelles Dosierungssystem in das Tränkewasser. Im ersten und im dritten Feldversuch entsprachen die aus Messungen im Tränkewasser ermittelten Dosen der im Vorfeld angestrebten Dosis von \log_{10} 7,5 PbE/Tier. Dies bestätigt, dass die Applikation über das Tränkewasser möglich ist. Im zweiten Feldversuch lag die aus der Messung im Tränkewasser ermittelte Dosis von \log_{10} 5,8 PbE/Tier deutlich unter der angestrebten Dosis. Die aus der Messung nach dem Transport ermittelte Dosis von \log_{10} 7,9 PbE/Tier lag dagegen sogar darüber (KITTLER et al. 2013). Ein Verlust der Phagen-Konzentration in dem Tränkeleitsystem ist wahrscheinlich. Die Ursache könnte eine Adsorption von

Phagen an Biofilme oder an im Tränkesystem vorhandene *Campylobacter* sein (NEWELL u. FEARNLEY 2003; SIRINGAN et al. 2011; HERMANS et al. 2012).

Bei ausreichender Konzentration von Wirtsbakterien können sich Bakteriophagen vermehren. Daher kann in diesem Fall auch eine geringe verabreichte Bakteriophagen-Dosis zu einer hohen Bakteriophagen-Konzentration im Darminhalt führen. Diese kann dann eine Reduktion der Wirtsbakterien hervorrufen (auch als aktive Phagentherapie bezeichnet). In mathematischen Modellen wurde ermittelt, dass hierfür eine minimale Konzentration der Wirtsbakterien von $\log_{10} 5$ KbE/ml vorhanden sein muss (sog. Critical-host-cell-concentration-threshold) (HAGENS u. LOESSNER 2010). Daraus folgern die Autoren, dass in einem System, in dem nicht genügend Wirtsbakterien für die Vermehrung der Bakteriophagen vorhanden sind, eine Mindestdosis von $\log_{10} 8$ PbE/ml Vermehrungs- Substanz (z.B. Medium oder Darminhalt) nötig ist. Diese hohe Phagen-Dosis gewährleistet eine Reduktion der Wirtsbakterien im ersten Infektionszyklus schon vor der Vermehrung (so genannte passive Phagentherapie). Bigwood et al. (BIGWOOD et al. 2009) führten *In-vitro*-Versuche zu diesem Modell durch, die bestätigten, dass die Zahl inaktivierter Wirtszellen von der Phagen-Konzentration und der Inkubationsdauer abhängen. Bei niedrigen Konzentrationen der Wirtsbakterien hat vor allem die Phagen-Konzentration einen Einfluss auf die Anzahl infizierter und lysierter Wirtszellen (BIGWOOD et al. 2009; CAIRNS et al. 2009). In ihrer Studie schlussfolgern die Autoren für die Praxis, dass eine Phagen-Konzentration von $\log_{10} 7-8$ PbE/ml nötig ist, um eine Reduktion um mehrere Zehnerpotenzen zu erreichen. Sie betonen jedoch auch, dass die Reduktion stark von der Adsorption der Bakteriophagen an die Wirtsbakterien abhängt. Bei einer hohen Adsorptionskonstante kann schon eine Applikation von $\log_{10} 5$ PbE/ml bei einer Inkubation über 7 Tage eine signifikante Reduktion zur Folge haben (BIGWOOD et al. 2009). Experimentelle Untersuchungen zu Infektionsmodellen mit *Campylobacter* und Bakteriophagen führten auch Cairns et al. durch (CAIRNS et al. 2009). Die Ergebnisse bestätigen die Existenz einer minimalen Wirts-Konzentration, die für die Vermehrung von Bakteriophagen nötig ist. Sind ausreichend Wirtsbakterien für eine Vermehrung der Bakteriophagen vorhanden, kommt es nach einer Verzögerung zu einer dosisunabhängigen

Vermehrung der Bakteriophagen und zu einer Reduktion der Bakterien. Die Verzögerung ist selbst in *In-vitro*-Versuchen größer als es durch die ermittelte Zeit zwischen Zellinfektion und -lyse erklärbar ist (CAIRNS et al. 2009). Die tatsächlichen *In-vivo*-Konzentrationen und Infektionsbedingungen der Feldversuche können nicht genau ermittelt werden. Es wird jedoch deutlich, dass eine zu geringe Phagenkonzentration im Tier in Kombination mit einer geringen *Campylobacter*-Konzentration zu einem Ausbleiben der gewünschten Reduktion führen kann.

4.4.2. Bakteriophagen-Konzentration

Die Untersuchung aller Proben auf Bakteriophagen erfolgte, um zu detektieren, ob sich die Bakteriophagen vermehrten. Es wurden jeweils neun Proben pro Stall am Applikationstag, einen Tag nach der Phagenapplikation und an weiteren regelmäßigen Terminen sowie bei der Schlachtung untersucht. Vor der Phagenapplikation waren alle Proben frei von Bakteriophagen (KITTLER et al. 2013).

In den Proben der Kontrollgruppen von Feldversuch 1 und 2 wurden keine Bakteriophagen nachgewiesen (Nachweisgrenze 50 PbE/g Probenmaterial). In der Kontrollgruppe von Feldversuch 3 traten vier Tage nach Applikation Bakteriophagen auf (Publikation 1: Abbildung 1). In diesem Versuch wurden vermutlich versehentlich Bakteriophagen in die Kontrollgruppe eingeschleppt. Die Konzentration in den Proben entsprach der Versuchsgruppe. Aufgrund dieser hohen Konzentration ist ein Eintrag von Bakteriophagen aus dem Versuchsstall wahrscheinlicher als ein Eintrag aus der Umwelt. Es war in diesem Versuch nicht möglich, einen Stiefelwechsel des Stallpersonals zwischen den Ställen einzuführen. Dies könnte die Ursache der Kontamination sein.

Im ersten Feldversuch wurden 24 Stunden nach der Phagenapplikation keine Bakteriophagen nachgewiesen. Die Ursache hierfür könnten lange Transportwege und unzureichende Kühlung gewesen sein. Die Lagerungsfähigkeit von Bakteriophagen in Kot war in *In-vitro*-Untersuchungen unter Kühlung mit Kühlakkus wesentlich niedriger als bei exakt 4 °C in einer mobilen Kühlzelle (Kittler et al.,

unveröffentlichte Ergebnisse). Die Transportbedingungen wurden für Feldversuch 2 und 3 entsprechend angepasst. In Feldversuch 1 traten in vier Blinddarmproben sechs Tage nach der Applikation Bakteriophagen auf. Die Konzentrationen betragen zwischen \log_{10} 1,66 und \log_{10} 2,14 PbE/g Blinddarminhalt. Diese Konzentrationen entsprechen in etwa den Messungen einen Tag nach der Applikation in Feldversuch 2 und 3. Studien weisen darauf hin, dass Bakteriophagen in Abwesenheit eines passenden Wirtsbakteriums in Masthähnchen nach 24 Stunden (LOC CARRILLO et al. 2005) nicht mehr nachweisbar sind (LOC CARRILLO et al. 2005). Selbst bei extrem hoher Anreicherung von Bakteriophagen in den Ställen und täglicher Applikation hoher Dosen über einen Zeitraum von zehn Tagen wurden 15 Tage später keine Bakteriophagen mehr im Kot nachgewiesen (WAGENAAR et al. 2005). Bei geringer Burst-Size, also der Freisetzung weniger Bakteriophagen pro infiziertem Bakterium, kann ein Bakteriophagen-Verlust - z.B. durch Adsorption an Ingesta oder Ausscheidung - einen sichtbaren Anstieg der Konzentration verhindern (SIRINGAN et al. 2011). Die Burst-Size ist vor allem von dem Wirtsbakterium abhängig (HYMAN u. ABEDON 2010). Der Phagennachweis in Feldversuch 1, sechs Tage nach der Applikation, spricht daher für eine Phagenvermehrung, auch wenn die Konzentration für diesen Zeitpunkt nicht hoch erscheint.

Die Proben der Versuchsställe des zweiten und dritten Feldversuchs wiesen einen Tag nach der Phagenapplikation Bakteriophagen auf (Publikation 1: Abbildung 1). Die Messungen lagen in Feldversuch 2 zwischen 0 und \log_{10} 2 PbE/g Kot. Die Konzentrationen in Feldversuch 3 lagen zwischen 0 und \log_{10} 1,71 PbE/g. Der Mittelwert betrug in beiden Versuchen \log_{10} 0,4 PbE/g Kot. In einer Studie von Loc Carrillo et al. in *Campylobacter*-freien Hähnchen betrug die Phagen-Konzentration zu diesem Zeitpunkt \log_{10} 3,5 bis 4,1 PbE/g Darminhalt (LOC CARRILLO et al. 2005). Fischer et al. applizierten den in den Feldversuchen verwendeten Cocktail an *Campylobacter*-positive Hähnchen. Bei einer Dosis von \log_{10} 7 PbE/Tier ergaben sich einen Tag nach der Applikation Phagen-Konzentrationen mit Mittelwerten von \log_{10} 6,1 und \log_{10} 5 PbE/g Blinddarminhalt (FISCHER et al. 2013). Im Vergleich zu diesen Ergebnissen erscheinen die in den Feldversuchen nachgewiesenen Bakteriophagen-Konzentrationen gering. In den Versuchen von Loc Carrillo et al. (2005) und Fischer

et al. (2013) wurde jedoch bei der Applikation CaCO_3 zugegeben. Dies führt zu einer Pufferung der Magensäure und einer erhöhten Überlebensrate von Bakteriophagen im Magen (CARVALHO et al. 2010). In den Feldversuchen war die Anwendung der Bakteriophagen mit einem Puffer aufgrund der Tränkewasserdosierung nicht möglich. In unserem *In-vivo*-Vorversuch wurde die Bakteriophagenapplikation mit dem Puffer CaCO_3 durchgeführt. Hier betrug der Mittelwert einen Tag nach der Applikation 3,6 PbE/g Blinddarminhalt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Loc Carrillo et al. (2005) überein. Daher ist der geringere Nachweis in den Feldversuchen einen Tag nach der Applikation eventuell auf eine erhöhte Inaktivierung der Phagen oder auf die verwendete Probenmatrix (Kot statt Blinddarminhalt) zurückzuführen.

Im weiteren Verlauf des zweiten Feldversuches traten vier Tage nach der Applikation in einer Probe der Versuchsgruppe einzelne Plaques (\log_{10} 0,48 PbE/g Kot) auf. In den darauf folgenden Untersuchungen konnten keine weiteren Bakteriophagen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass im zweiten Feldversuch keine Phagenvermehrung stattgefunden hat und die Bakteriophagen nach vier Tagen vollständig ausgeschieden waren.

Im weiteren Verlauf des dritten Feldversuchs stieg die Phagen-Konzentration in der Versuchsgruppe über \log_{10} 5 PbE/g Probenmaterial an (Publikation 1: Abbildung 1). Die nachgewiesenen Konzentrationen sieben Tage nach Phagenapplikation schwankten zwischen \log_{10} 0,3 und \log_{10} 7,29 PbE/g Blinddarminhalt. Auch in der Kontrollgruppe wurden steigende Konzentrationen nachgewiesen. Diese Konzentrationen zeigen, dass sich die Bakteriophagen im dritten Feldversuch vermehrt haben.

Die großen Schwankungen stimmen in etwa mit den Ergebnissen aus natürlich mit Bakteriophagen kolonisierten Hähnchenherden überein (ATTERBURY et al. 2005). So wiesen natürlich mit Bakteriophagen kolonisierte Broilerherden Konzentrationen zwischen \log_{10} 1,5 und \log_{10} 6,9 PbE/g Blinddarminhalt auf (ATTERBURY et al. 2005). Im Vergleich dazu wiesen experimentelle *In-vivo*-Studien eine gleichmäßigere Verteilung der Bakteriophagen in der Herde nach (LOC CARRILLO et al. 2005;

WAGENAAR et al. 2005; FISCHER et al. 2013). In einer Studie von Loc Carrillo et al. (LOC CARRILLO et al. 2005) wurden über die gesamte Versuchsdauer von fünf Tagen Konzentrationen zwischen \log_{10} 3,2 und 6,5 PbE/g Darminhalt nachgewiesen. Andere *In-vivo*-Studien wiesen Phagen-Konzentrationen zwischen \log_{10} 5 und \log_{10} 8 PbE/g Kot (WAGENAAR et al. 2005) nach. Fischer et al. applizierten den in den Feldversuchen verwendeten Cocktail an *Campylobacter*-positive Hähnchen. Bei einer Versuchsdauer von 45 Tagen konnten über den gesamten Beobachtungszeitraum Konzentrationen zwischen \log_{10} 3,2 und \log_{10} 5 PbE/g Blinddarminhalt nachgewiesen werden (FISCHER et al. 2013). In diesen experimentellen *In-vivo*-Versuchen hatte jedes Tier einzeln eine gleich große orale Dosis eingegeben bekommen (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; FISCHER et al. 2013). In den Feldversuchen wie auch in natürlich mit Bakteriophagen kolonisierten Herden kann dagegen davon ausgegangen werden, dass verschiedene Tiere unterschiedliche Phagemengen zu sich genommen haben. Wie bei der Applikation über das Tränkewasser üblich, war in den Feldversuchen bereits einige Zeit vor der Applikation das Tränkewasser entzogen worden, um eine schnelle und möglichst gleichmäßige Aufnahme zu gewährleisten. Eine weitere Möglichkeit, um die Verteilung der Bakteriophagen in der Herde zu optimieren, ist die wiederholte Applikation an mehreren aufeinander folgenden Tagen (WAGENAAR et al. 2005) oder die kontinuierliche Applikation über einen längeren Zeitraum. Eine wiederholte Applikation ist jedoch mit einem erhöhten Arbeitsaufwand für den Landwirt verbunden und eine kontinuierliche Applikation setzt die Stabilität der Bakteriophagen im Dosierungs- und Tränkesystem voraus. Eine Applikation über das Futter ergab in *In-vivo*-Versuchen unter experimentellen Bedingungen einen Mittleren Phagennachweis von \log_{10} 3,4 PbE/g Kot bei einem Standardfehler von 0,2 zwei Tage nach der Applikation (CARVALHO et al. 2010). Die Applikation von Bakteriophagen über das Futter ist allerdings in der Praxis schwer umzusetzen. Die kontinuierliche Applikation über mehrere Tage könnte bei ausreichender Stabilität der Bakteriophagen in der Zukunft eine Rolle spielen.

4.4.3. *Campylobacter*-Konzentration

In den Feldversuchen wurden vor der Applikation des Bakteriophagen-Cocktails pro Stall neun Kotproben entnommen und quantitativ auf *Campylobacter* untersucht. Es konnten in allen Ställen mittlere *Campylobacter*-Konzentrationen von \log_{10} 0,5- 4,6 PbE/g Kot nachgewiesen werden, die Nachweisgrenze betrug 50 KbE/g Probenmaterial (Publikation 1: Abbildung 1). Weitere Untersuchungen fanden an regelmäßigen Terminen sowie bei der Schlachtung statt. Signifikante Reduktionen der *Campylobacter*-Konzentration konnten in der Versuchsgruppe von Feldversuch 1 und nach dem Nachweis von Bakteriophagen in der Kontrollgruppe von Feldversuch 3 beobachtet werden (KITTLER et al. 2013). Die Reduktion betrug jeweils über zwei Zehnerpotenzen. Zeitpunkt und Dauer der signifikanten *Campylobacter*-Reduktion lagen in dem in der Literatur beschriebenen Rahmen. In bisherigen Studien wurden Reduktionen von \log_{10} 1,4 bis 5,6 KbE/g ab 24 Stunden bis sieben Tage nach der Phagenapplikation beobachtet. Konzentrationssenkungen in dem beschriebenen Umfang werden als dienlich für die Reduktion der humanen *Campylobacter* angesehen (EFSA 2011). Der Zeitpunkt der maximalen Reduktion lag in den meisten Untersuchungen ein bis vier Tage nach der Phagenapplikation (LOC CARRILLO et al. 2005; WAGENAAR et al. 2005; CARVALHO et al. 2010). In den von FISCHER et al. (FISCHER et al. 2013) durchgeführten Untersuchungen variierte der Zeitpunkt der maximalen Reduktion bei gleichem Versuchsaufbau zwischen 3 und 21 Tagen nach der Phagenapplikation.

Obwohl die Ställe vor der Phagenapplikation zufällig in Versuchs- und Kontrollstall eingeteilt wurden, wiesen die Proben der Versuchsställe in Feldversuch 2 und 3 schon vor der Phagenapplikation geringere *Campylobacter*-Konzentrationen auf als die Kontrollställe (Publikation 1: Abbildung 1). Da die Reduktion im Versuchsstall im Vergleich zur Kontrollgruppe beurteilt wurde, war eine von der *Campylobacter*-Ausgangskonzentration unabhängige Beurteilung wünschenswert. Die Kolonisationsverläufe in den Herden stellten hierfür ein wichtiges Merkmal dar. Die vollständige Kolonisation von Hähnchenherden mit *Campylobacter* erfolgt innerhalb weniger Tage nach Eintrag der Bakterien in die Herde. Basierend auf Felddaten

wurde gezeigt, dass ein *Campylobacter*-positives Hähnchen im Mittel 2,37 weitere Hähnchen infiziert und nach diesem Modell eine Herde von 20 000 Tieren spätestens eine Woche nach dem *Campylobacter*-Eintrag eine Innerherden-Prävalenz von 95% aufweist (VAN GERWE et al. 2009). Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (STERN et al. 2001). Die Kontrollgruppen aller Feldversuche wiesen spätestens acht Tage nach dem ersten Nachweis von *Campylobacter* in allen Proben *Campylobacter*-Konzentrationen von über \log_{10} 3,81 KbE/g Kot auf. Dies stimmt mit den Berechnungen von van Gerwe et al. (VAN GERWE et al. 2009) überein.

Im Gegensatz dazu verlief die Kolonisation in den Versuchsgruppen des ersten und dritten Feldversuches nach der Phagenapplikation verzögert (VAN GERWE et al. 2009). Im ersten Feldversuch wurde acht Tage nach dem ersten *Campylobacter*-Nachweis in der Herde nur in sieben der neun Proben *Campylobacter* nachgewiesen. Im dritten Feldversuch wurde erst zehn Tage nach dem ersten Nachweis von *Campylobacter* in allen Proben *Campylobacter* nachgewiesen. Diese Ergebnisse weichen von den Berechnungen von van Gerwe et al. ab (VAN GERWE et al. 2009). Die Zeit bis zum Nachweis von *Campylobacter* in allen Proben war länger als in den Kontrollgruppen. Im zweiten Feldversuch waren einen Tag nach der Phagenapplikation alle neun Proben *Campylobacter*-positiv. Im weiteren Versuchsverlauf wurde jedoch erst bei der letzten Untersuchung wieder in allen Proben *Campylobacter* nachgewiesen. Auch wenn diese Überlegungen nur Anhaltspunkte für eine Optimierung des Anwendungskonzeptes geben, sollten sie in zukünftige Feldversuche einbezogen werden.

Die Ergebnisse dieser ersten Feldversuche weisen auf einen optimalen Applikationszeitpunkt zwei bis vier Tage vor der Schlachtung hin, machen jedoch zugleich deutlich, dass eine genauere Steuerung des Zeitpunktes und der Stärke der Reduktion für die kommerzielle Anwendung von Phagen nötig sind. Hierfür könnten höhere Dosen (passive Reduktion) und ein besseres Verständnis der Interaktion von Phagen und Wirtsbakterium von großem Nutzen sein.

4.5. Populationsdynamik von *Campylobacter* nach der Phagenapplikation

4.5.1. Sequenz-Typen und Biotypen

Insgesamt 412 *Campylobacter*-Isolate wurden mittels ApiCampy auf ihren Biotyp untersucht. Die Ergebnisse sind in der ersten Publikation in Abbildung 2 dargestellt. Alle untersuchten Isolate gehörten *C. jejuni* ssp *jejuni* biotyp 1 oder 2 an. Die 412 untersuchten Isolate setzten sich zusammen aus jeweils 22 Isolaten pro Untersuchungstag aus den Versuchsställen sowie jeweils 22 Isolaten des ersten und letzten Untersuchungszeitpunktes aus den Kontrollgruppen. Die Verteilung der Biotypen in den Kontrollgruppen der Feldversuche 1 und 2 wies zwischen erstem und letztem Untersuchungszeitpunkt nur geringe Veränderungen auf. Einige der im ApiCampy untersuchten Enzyme spielen in der Kolonisation von *Campylobacter* eine Rolle (BARNES et al. 2007; NOVIK et al. 2010). Eine annähernd gleiche Verteilung der Biotypen vor und nach dem Versuch könnte daher auf gleich bleibende Kolonisationsbedingungen hindeuten. Die Verteilungen in der Versuchsgruppe wiesen in Feldversuch 1 gleichfalls kaum Veränderungen auf. In der Versuchsgruppe von Feldversuch 2 stieg die Nachweisrate von Biotyp 1 einen Tag nach der Phagenapplikation drastisch an. In Feldversuch 3 stieg dagegen die Nachweisrate von Biotyp 2 in beiden Gruppen während des Versuches an. Diese Veränderungen könnten aufgrund eines veränderten Selektionsdruckes durch die Phagen in Feldversuch 3 zustande gekommen sein. Andere Studien hatten ähnliche Beobachtungen gemacht (EL-SHIBINY et al. 2005; SCOTT et al. 2007a). In Feldversuch 2 ist dies allerdings unwahrscheinlich, weil keine Phagenvermehrung nachgewiesen wurde.

Die Ergebnisse der MLST-Analyse wiesen eine andere Verteilung als die Biotypen auf. In Feldversuch 1 wurde nur ein ST nachgewiesen, wobei es möglich ist, dass ein zweiter oder weitere STs mit geringer Prävalenz wegen der geringen Stichprobenzahl übersehen wurden. Im zweiten und dritten Feldversuch wurden zwei

STs nachgewiesen. Isolate eines STs wiesen jedoch unterschiedliche Biotypen auf, wie in Tabelle 3 der ersten Publikation zu sehen ist. Unterschiedliche Phänotypen innerhalb eines STs können durch Gen-Expressionsmuster oder durch genetische Unterschiede außerhalb der Housekeeping-Gene zustande kommen (TABOADA et al. 2008; GRIPP et al. 2011). Welche Ursache das Auftreten von zwei Biotypen innerhalb eines STs hatte und welche Kolonisationsvorteile zu dem gehäuftem Nachweis von Biotyp 2 nach der Phagenapplikation geführt haben könnten, wurde für den 3. Feldversuch im Verlauf der Studie untersucht (KITTLER et al. 2014). In einer epidemiologischen Studie hatten auch Connerton et al. (CONNERTON et al. 2004) darauf hingewiesen, dass die *Campylobacter*-Kolonisation, in Anwesenheit von lytischen Bakteriophagen, im Feld eher durch neue Genotypen als durch erworbene Resistenzen bestehen bleibt.

Den Einfluss von Bakteriophagen auf die Kolonisation von *Campylobacter* zu verstehen, bildet die Grundlage für ein effektives Konzept zur Reduktion durch Bakteriophagen (ATTERBURY et al. 2005; EL-SHIBINY et al. 2005). Unsere Untersuchungen zeigen, dass in einem zukünftigen Anwendungskonzept, wie oben dargestellt, auch das Auftreten anderer *Campylobacter*-Stämme oder Biotypen einbezogen werden muss, weil *Campylobacter* ubiquitär auftritt und eine hohe Variabilität aufweist (DE BOER et al. 2002). Dies kann eine effektive Reduktion gefährden (CONNERTON et al. 2004). Es birgt die Gefahr, durch Anwendung von Bakteriophagen lediglich die Biotypen- oder Stammzusammensetzung von *Campylobacter* zu modifizieren, jedoch keine effektive Reduktion zu erreichen. Wenn durch die Auswahl der Bakteriophagen das Auftreten stark kolonisierender Stämme gezielt bekämpft würde, könnte dies zu einer reproduzierbareren Reduktion von *Campylobacter* in Broilerherden führen.

4.5.2. Phagen-Empfänglichkeit der *Campylobacter*-Isolate

Die Phagen-Empfänglichkeit von 668 *Campylobacter*-Isolaten aus dem 3. Feldversuch wurde untersucht. Die Verteilung der Proben mit empfänglichen und

unempfindlichen Isolate ist in Abbildung 2 der zweiten Publikation zusammengefasst. In dieser Abbildung wurden alle Isolate mit Plaquebildung als empfänglich eingestuft. Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, nimmt der Anteil empfindlicher *Campylobacter*-Isolate in beiden Ställen im Versuchsverlauf zu. Dies legt nahe, dass die unempfindlichen *Campylobacter*-Isolate per se unempfindlich sind und nicht erst im Versuchsverlauf eine Resistenz erworben haben. Die empfindlichen Isolate scheinen in diesem Versuch nach der Phagenapplikation keine Kolonisations-Nachteile gegenüber den unempfindlichen zu haben. Sie scheinen sich im Gegenteil durchzusetzen. In anderen *In-vivo*-Studien wurden ähnliche Effekte beobachtet (CONNERTON et al. 2004; LOC CARRILLO et al. 2005; SCOTT et al. 2007b). In der kontaminierten Kontrollherde tauchen allerdings am Ende des Versuches wieder unempfindliche *Campylobacter*-Isolate auf, was in diesem Fall auf erworbene Resistenzen hindeuten könnte. Vorhergehende *In-vivo*-Versuche unter experimentellen Bedingungen (LOC CARRILLO et al. 2005) wiesen bei 4% der untersuchten *Campylobacter*-Isolate Resistenzen gegen die applizierten Bakteriophagen nach. In *In-vitro*-Versuchen waren es 11%. Carvalho et al. (CARVALHO et al. 2010) wiesen schon vor der Applikation bei 6% der untersuchten *Campylobacter*-Isolate eine Unempfindlichkeit nach. Sieben Tage nach der Applikation waren 13% unempfindlich. Die von Fischer et al. (FISCHER et al. 2013) mit dem in den Feldversuchen verwendeten Cocktail durchgeführten *in-vivo*-Versuche ergaben eine Resistenzentwicklung, die nach zwei Wochen einen Höhepunkt erreichte und dann wieder abnahm. Nach knapp sieben Wochen lag der Anteil phagen-empfindlicher Isolate wieder bei über 90%. Resistenzen gegen den Phagen NCTC 12672 hielten besonders lange an (FISCHER et al. 2013). Unterschiede in den Resistenzmechanismen gegen einzelne Cocktailphagen sind bereits von Coward et al. beschrieben worden (COWARD et al. 2006).

Auch wenn in mehreren *In-vivo*-Studien eine Resistenzentwicklung beobachtet wurde, zeigen die Ergebnisse eigener Untersuchungen erstmals, dass unter Praxisbedingungen das Auftreten a priori resistenter Stämme eine größere Herausforderung zu sein scheint (CONNERTON et al. 2004). Die Auswahl von Bakteriophagen mit unterschiedlichen Wirtsspektren oder die bestandsspezifische

Auswahl der Phagen könnte diesem Problem entgegenwirken. Eine Applikation kurz vor der Schlachtung wird als effektive Maßnahme gegen die Entstehung und Ausbreitung resistenter Stämme angesehen (JANEZ u. LOC-CARRILLO 2013). Wagenaar et al. (WAGENAAR et al. 2005) halten eine Verbreitung von Bakteriophagen in der Umwelt für unproblematisch und schlagen einen regelmäßigen Wechsel der angewendeten Bakteriophagen vor, um aufkommende Resistenzen zu minimieren.

4.5.3. Kolonisationsfaktoren und Phagen-Empfänglichkeit

Campylobacter ist ein gramnegatives, motiles Bakterium (SELBITZ 2007). Als hauptsächliche Energiequelle nutzt es Aminosäuren (HOFREUTER et al. 2008). *Campylobacter* besitzt ein bewegliches Flagellum, auf dessen Integrität und Beweglichkeit unterschiedliche Gene einen Einfluss haben (HERMANS et al. 2011). Für die Kolonisation von Hähnchen spielen diese Eigenschaften des Flagellums eine große Rolle, der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht geklärt (MERTINS et al. 2013). Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) ist ein Enzym, das Glutathion zu Glutamat und einem Cysteinglycin-Dipeptid umsetzt und Glutathion sowie Glutamin unter Freisetzung von Glutamat hydrolysiert (TATE u. MEISTER 1981). Diese Aminosäuren stellen für *Campylobacter in vivo* eine zusätzliche Nährstoffquelle dar (HOFREUTER et al. 2008). Studien wiesen bei GGT-defizienten und nichtmotilen *Campylobacter*-Stämmen eine verringerte Fähigkeit zur Kolonisation in Hähnchen nach (GUERRY et al. 1991; WASSENAAR et al. 1993; YAO et al. 1994; AHMED et al. 2002; CARRILLO et al. 2004; GAYNOR et al. 2004; HENDRIXSON u. DIRITA 2004; BARNES et al. 2007; RATHBUN et al. 2009; NOVIK et al. 2010; MERTINS et al. 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Motilität und GGT-Aktivität bei allen 668 Isolaten aus dem 3. Feldversuch untersucht (KITTLER et al. 2014). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen korrelierten signifikant mit der Phagen-Empfänglichkeit. Phagen-empfindliche *Campylobacter*-Isolate wiesen signifikant

häufiger GGT-Aktivität auf ($p < 0,0001$). Gleichzeitig wiesen sie eine signifikant höhere Motilität auf ($p < 0,0001$). Ein Zusammenhang zwischen Motilität und Phagen-Empfänglichkeit wurde in *In-vitro*-Studien bereits beobachtet (COWARD et al. 2006; SCOTT et al. 2007b). In anderen Studien wurde *in vivo* ein Kolonisationsvorteil von phagen-empfindlichen Isolaten beobachtet, jedoch nur in Abwesenheit von Bakteriophagen (LOC CARRILLO et al. 2005; SCOTT et al. 2007a). Im Gegensatz zu unserer Studie verschwand er, wenn Bakteriophagen anwesend waren. Auch reduziert sich bei resistenten *Campylobacter*-Isolaten teilweise die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen (SIRINGAN et al. 2011). Als Ursache für die Resistenzen wurden in Studien unterschiedliche Mechanismen auf genetischer Ebene nachgewiesen: horizontaler Gentransfer von 112 kb (SCOTT et al. 2007a), intragenome Inversion zwischen Mu-like-Prophagen-Sequenzen von bis zu 590 kb (SCOTT et al. 2007b) oder die Veränderung der O-methyl-phosphoramidate Moietät (MeOPN) der kapsulären Polisaccharide (CPS) durch Phasenvariation im Gen der MeOPN-Transferase (SORENSEN et al. 2011; HOLST SORENSEN et al. 2012). Bei *In-vivo*-Versuchen zur Kolonisation der resistenten *Campylobacter* ohne Bakteriophagen fand teilweise eine erneute Veränderung der Isolate zum empfindlichen Phänotyp mit Reversion der genetischen Veränderung statt (SCOTT et al. 2007b). Coward et al. (COWARD et al. 2006) untersuchten die Resistenzbildung von *Campylobacter*-Isolaten gegen die im Cocktail verwendeten Bakteriophagen. Sie stellten dar, dass sich die Resistenzbildung *in vivo* in vier Gruppen einteilen lässt (Gruppe A-D): Die *Campylobacter*-Isolate einer Resistenzgruppe weisen jeweils Kreuzresistenzen gegen mehrere Bakteriophagen sowie spezifische Veränderungen auf, z.B. in der Motilität. Eine verringerte Motilität wurde in diesen Versuchen nur für Resistenzen der Gruppe D beobachtet. Die im Cocktail der Feldversuche verwendeten Isolate gehören der Gruppe A und C an. Für die Gruppe A, zu der die im Cocktail verwendeten Bakteriophagen NCTC 12673 und 12674 gehören, fanden Coward et al. eine genetische Veränderung der kapsulären Polisaccharide als Ursache für die Resistenz. Für die im Cocktail verwendeten Bakteriophagen NCTC 12678 und 12672 der Gruppe C fanden sie insgesamt eine deutlich geringere Resistenzentwicklung (COWARD et al. 2006). Ein

Zusammenhang zwischen GGT-Aktivität und der Motilität wurde bisher nicht beschrieben, es ist jedoch bekannt, dass die Motilität von *Campylobacter*-Isolaten durch unterschiedliche Stoffwechselfprozesse beeinflusst wird (HERMANS et al. 2011). In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie kann also von einem Kolonisationsvorteil phagen-empfindlicher Isolate durch die erhöhte Motilität und GGT-Aktivität ausgegangen werden. Ob dieser Kolonisationsvorteil reversibel ist und ob er auf genetischer Ebene zustande kommt, wurde nicht untersucht. Die eigenen Ergebnisse unterstreichen jedoch, dass ein Konzept der Phagenanwendung zur *Campylobacter*-Reduktion die hohe genetische Variabilität und unterschiedliche Resistenzmechanismen von *Campylobacter*-Isolaten einbeziehen muss. Dies kann nur auf der Grundlage von bekannten Erreger-Wirts-Interaktion in der Phagentherapie erfolgen. Cocktails könnten für die Minimierung der Resistenzentwicklung eine Rolle spielen (O'FLYNN et al. 2004; TANJI et al. 2004). Weitere Studien zu der Frage, wie Selektion und Populationsdynamik von *Campylobacter* in kommerziellen Ställen von Bakteriophagen beeinflusst wird, sind dringend notwendig. Die Auswahl der applizierten Bakteriophagen sollte darauf abgestimmt werden, dass die Resistenzentwicklung insgesamt verzögert wird.

4.6. Ausblick

In der Anwendung von Bakteriophagen zur Reduktion von *Campylobacter* sind auf unterschiedlichen Ebenen noch Entwicklungen nötig, um zu einem marktfähigen Anwendungskonzept zu gelangen. Erstens konnten bisher keine reproduzierbaren signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Zweitens besteht Forschungsbedarf zum Risiko der Anwendung, beispielsweise im Zusammenhang mit einer erhöhten Virulenz von unempfindlichen *Campylobacter*-Stämmen. Drittens bestehen seitens der Zulassung Unklarheiten hinsichtlich der rechtlichen Einstufung, die auch die Frage nach der Anwendung mehrerer Bakteriophagen zur Minimierung der Resistenzentwicklung betreffen.

Die vorliegende Studie liefert erstmals Ergebnisse zur Effektivität von *Campylobacter*-Bakteriophagen unter Feldbedingungen (KITTLER et al. 2013). Nachdem die hier vorgeschlagenen Änderungen für die Dosis, den Applikationszeitpunkt und die Cocktail-Zusammensetzung in den Versuchsaufbau eingearbeitet wurden, sollte das Anwendungskonzept erneut getestet werden. Um die Sicherheit des Verbrauchers zu gewährleisten, sollten weitere Untersuchungen zur Virulenz und Pathogenität von *Campylobacter* im Zusammenhang mit der Anwendung von Bakteriophagen durchgeführt werden (LOUWEN et al. 2013). Die für einen Cocktail vorgeschlagenen Bakteriophagen sollten in diesem Sinne die von Hagens und Lössner geforderten Eigenschaften aufweisen: (1) Ein breites Wirtsspektrum, (2) strikt lytisch (virulent), (3) auf einem apathogenen Wirt vermehrt, (4) vollständig sequenziert, (5) keine bakterielle DNA enthaltend, (6) keine Virulenzgene oder Gene allergener Proteine enthaltend, (8) keine Nebenwirkungen in klinischen Studien, (7) anerkannt als „Generally recognized as safe“ (GRAS), (9) chemisch stabil, (10) in großen Mengen produzierbar (HAGENS u. LOESSNER 2010). Der angewendete Cocktail wurde unter Einhaltung der Forderungen 1, 2, 8 und 9 zusammen gestellt (HIRSCH 2010). Bei der Food and Drug Administration (FDA) wurden unterschiedliche Phagenprodukte als GRAS beurteilt. Die EFSA hat bisher nur eine wissenschaftliche Stellungnahme zur Effektivität von Bakteriophagen herausgegeben, Stellungnahmen zur Sicherheit stehen aus (EFSA 2009). In der vorliegenden Studie wurde eine Methode zur Herstellung großer Mengen entwickelt, die für die industrielle Produktion abgewandelt werden könnte. Da bisher nur ein klassisches Virulenzgen (mit unklarer Funktion in der Pathogenese von *Campylobacter*) identifiziert wurde (YOUNG et al. 2007), ist auch die klassische Definition der Apathogenität schwierig auf *Campylobacter*-Isolate anzuwenden. Weitere bestehende Unklarheiten zur Zulassung von Präparaten, die Bakteriophagen enthalten, können vermutlich nur durch praktische Erfahrungen gelöst werden. Unterschiedliche Präparate sind zur Anwendung in Lebensmitteln auf dem Markt (LOUWEN u. VAN BAARLEN 2013). Die EFSA zeigt zwei unterschiedliche Wege der Zulassung für die Anwendung in der Primärproduktion auf: Als Futtermittelzusatzstoff oder als Tierarzneimittel (EFSA 2011). Seitens der Industrie bestehen einzelne

Versuche zur Zulassung von Phagen als Futtermittelzusatzstoffe in der Primärproduktion. Die Zukunft wird zeigen, welcher Weg erfolgreich sein wird.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen zur Effektivität von Bakteriophagen unter Praxisbedingungen im Rahmen von Minimierungsstrategien von *Campylobacter* beim Broiler

Sophie Kittler

Campylobacter spp. ist einer der häufigsten Erreger lebensmittelbedingter Durchfallerkrankungen in westlichen Industrieländern. Er ist ein kommensales Bakterium des Magen-Darm-Traktes von Geflügel. Das Robert Koch-Institut meldet jährlich steigende Zahlen humaner Infektionen bzw. eine stabile Zahl an Erkrankten auf hohem Niveau. Hauptinfektionsquellen für den Menschen sind kontaminiertes Geflügelfleisch und die Geflügelhaltung allgemein. Das effektivste Mittel zur Bekämpfung der humanen *Campylobacter*iose ist, *Campylobacter* in der Primärproduktion zu reduzieren. Die Anwendung von Bakteriophagen wird als Reduktionsstrategie diskutiert. Bakteriophagen sind Viren, die gezielt Bakterien einer Spezies oder eines Stammes infizieren und töten.

Ziel dieser Dissertation war es, einen *in vitro* zusammengestellten Bakteriophagen Cocktail auf seine Effektivität zur Reduktion von *Campylobacter* in Hähnchenmastbetrieben zu testen und Empfehlungen für diese Anwendung von Bakteriophagen zu entwickeln.

Es wurde ein Vorversuch durchgeführt, der die Effektivität des *in vitro* zusammengestellten Bakteriophagen Cocktails *in vivo* bestätigte. Untersuchungen auf *Campylobacter* und Bakteriophagen erfolgten 1, 3, 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Phagenapplikation. In diesem Vorversuch trat drei Tage nach der Phagenapplikation in der Versuchsgruppe eine signifikante *Campylobacter*-Reduktion von 1,7 KbE/g Blinddarminhalt verglichen mit der Kontrollgruppe auf. Anschließend fanden erstmals drei Feldversuche in kommerziellen

Hähnchenmastbetrieben statt. Es wurden jeweils neun Kotproben pro Gruppe vor der Applikation von Bakteriophagen sowie an drei bis fünf regelmäßigen Terminen bis zur Schlachtung auf *Campylobacter* und Bakteriophagen untersucht. Bei der Schlachtung wurden jeweils neun Blinddarmproben vom Schlachtband zur Untersuchung entnommen. Eine signifikante Reduktion von *Campylobacter* trat in zwei Versuchen auf. In einem dieser Versuche wurde *Campylobacter* einen Tag nach der Applikation von Bakteriophagen unter die Nachweisgrenze gesenkt (50 KbE/g Kot; $P= 0,014$). In einem zweiten Versuch kontaminierten Bakteriophagen die Kontrollgruppe, was zu einer signifikanten Reduktion führte ($P= 0,002$). Bakteriophagen wurden in allen Feldversuchen in den Kot bzw. Blinddarmproben der Versuchsgruppen und in der Kontrollgruppe des dritten Feldversuches nachgewiesen. Während der Versuche wurden etwa hundert *Campylobacter* Isolate pro Gruppe und Untersuchungszeitpunkt aus den Proben gewonnen. Isolate aller Gruppen wurden auf ihren Biotyp untersucht. In zwei Versuchsgruppen verschob sich das Verhältnis der Biotypen nach der Phagenapplikation zugunsten eines Biotyps (Biotyp 1 in Feldversuch 2; Biotyp 2 in Feldversuch 3). Zur weiterführenden Untersuchung der Kolonisationsprozesse unter dem Einfluss von Bakteriophagen wurden alle 668 im dritten Feldversuch gewonnenen Isolate auf die Phagen-Empfänglichkeit, die Motilität und auf die Aktivität des Enzyms Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) untersucht. Motilität und GGT-Aktivität sind Kolonisationsfaktoren. Sie korrelierten in der vorliegenden Untersuchung mit der Phagen-Empfänglichkeit. Phagen-empfindliche Isolate zeigten eine höhere Motilität und GGT-Aktivität. Sie wurden in Anwesenheit von Bakteriophagen häufiger isoliert als die unempfindlichen Isolate. Die Ergebnisse legen nahe, dass die phagen-empfindlichen Isolate die unempfindlichen Isolate aufgrund erhöhter Kolonisationsfähigkeit verdrängen konnten. MLST, MALDI-TOF und biochemischer Charakterisierung zeigten in den anschließend durchgeführten phylogenetischen Analysen keine Übereinstimmung der Cluster.

In dieser Studie wurden erstmals Versuche zur Anwendung *Campylobacter*-spezifischer Bakteriophagen unter kommerziellen Bedingungen durchgeführt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Bakteriophagen auch unter

Feldbedingungen zu einer signifikanten Reduktion von *Campylobacter* führen können. Es sind jedoch weitere Untersuchungen und Entwicklungen nötig, um reproduzierbare Ergebnisse in der Hähnchenmast zu erreichen. Es ließen sich anhand dieser Versuche Empfehlungen für die Phagenapplikation entwickeln, deren Anwendung zu reproduzierbaren Ergebnissen beitragen soll. Außerdem wurde die Populationsdynamik von *Campylobacter* in einem der Feldversuche untersucht. Phagen-unempfindliche Isolate wiesen eine reduzierte Kolonisation auf. Die Untersuchungen identifizierten zwei Kolonisationsfaktoren, die in diesen Isolaten vermindert waren: Motilität und GGT-Aktivität. Das Wissen um die Interaktion zwischen Bakteriophagen und Bakterien sowie der Kolonisation der Bakterien im Wirtsorganismus muss weiter ausgebaut werden, um eine effektive und nachhaltige Anwendung von Bakteriophagen zu ermöglichen.

6. Summary

Application field trials on bacteriophage efficacy for reduction of *Campylobacter*

Sophie Kittler

Campylobacter spp. is a commensal of the bird's intestine. It is one of the most frequent causes of foodborne illnesses in the western world. The Robert Koch Institute still recognizes an annually increasing or rather stable high incidence of human campylobacteriosis. Poultry meat and poultry keeping are the main sources of human infections. Reducing *Campylobacter* in primary production is the most effective measure for controlling the disease. Bacteriophage application is currently under discussion as a measure for *Campylobacter* reduction. Bacteriophages are viruses that infect and kill bacteria.

The aim of this study was to test the efficacy of an *in vitro* composed bacteriophage cocktail for reduction of *Campylobacter* in commercial broiler flocks and to develop recommendations for this use of bacteriophages.

The present study used a cocktail of four bacteriophages that was tested in a preliminary test *in vivo* as being effective. Quantitative testing of samples was carried out 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days post phage application. Three days post phage application a significant *Campylobacter* reduction of 1.7 CFU/g cecal content occurred in the experimental group compared to the control. Afterwards three field trials on commercial broiler farms were performed. Per group nine fecal samples were taken each, before and at certain dates after phage application until slaughter. Nine cecal samples of each group were taken directly from the production line when the animals were slaughtered. All samples were tested quantitatively for *Campylobacter* and bacteriophages. Significant reduction of *Campylobacter* occurred in two field trials: In one field trial *Campylobacter* was reduced under the detection limit (50 cfu/g feces, $P=0.014$) one day after phage application. In another field trial

the control group became cross contaminated by phages, followed by a significant drop in *Campylobacter* counts ($P= 0.002$). Bacteriophages were detected in samples of the experimental groups of all field trials and in the control group of the third field trial. During the trials, approximately 100 *Campylobacter* isolates were obtained from each group and sampling in all field trials. Isolates of all groups were tested for their biotype. In two experimental groups of the trials, proportions of the biotypes shifted after phage application in favour of one biotype (biotype 1 in field trial 2; biotype 2 in field trial 3). For further examination of the colonization process, all 668 isolates from the third field trial were tested for phage susceptibility, motility and Gamma Glutamyl Transferase (GGT) activity. Motility and GGT activity are important for *in vivo* colonization. In the present study, they correlated with phage susceptibility. Susceptible Isolates were more motile and exhibited GGT activity more often. They were more often isolated in presence of phages than the non susceptible isolates. Results suggest that they out-competed nonsusceptible isolates due to increased colonization ability. MLST, MALDI-TOF and biochemical analyses were carried out but clustering of phylogenetic comparisons did not agree.

Hence, in the present study first field trials under commercial conditions were carried out for phage application targeting *Campylobacter*. Results show that bacteriophages can reduce *Campylobacter* in commercial broiler flocks significantly. However, further investigations and developments of the method are necessary in order to achieve reproducible results under field conditions. From results of these trials recommendations were generated that intend to achieve this aim. Furthermore the population dynamics of *Campylobacter* in one field trial were investigated. Phage resistant isolates showed reduced colonization. Tests revealed two colonization factors that were reduced in these isolates: Motility and GGT activity. A better understanding of the interaction between phages, bacteria and colonization of bacteria in their host organism is necessary in order to use phages effectively and enduring for reducing *Campylobacter* in primary production.

7. Literaturverzeichnis

AHMED, I. H., G. MANNING, T. M. WASSENAAR, S. CAWTHRAW u. D. G. NEWELL (2002):

Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials.

Microbiology 148 (Pt 4), 1203-1212

ATTERBURY, R. J., E. DILLON, C. SWIFT, P. L. CONNERTON, J. A. FROST, C. E. DODD, C. E. REES u. I. F. CONNERTON (2005):

Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca.

Appl. Environ. Microbiol. 71 (8), 4885-4887

BARNES, I. H., M. C. BAGNALL, D. D. BROWNING, S. A. THOMPSON, G. MANNING u. D. G. NEWELL (2007):

Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*.

Microb. Pathog. 43 (5-6), 198-207

BERK, J. (2010):

Faustzahlen zur Haltung von Mastgeflügel.

in: K. DAMME und C. MÖBIUS: Geflügeljahrbuch 2011,

Ulmer K.G., Stuttgart, S. 144-145

BIGWOOD, T., J. A. HUDSON u. C. BILLINGTON (2009):

Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages.

FEMS Microbiol. Lett. 291 (1), 59-64

CAIRNS, B. J., A. R. TIMMS, V. A. JANSEN, I. F. CONNERTON u. R. J. PAYNE (2009):

Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy.

PLoS Path. 5 (1), e1000253

CARLSON, K. (2005):

Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches.

in: E. KUTTER und A. SULAKVELIDZE: Bacteriophages Biology and Applications,

CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 437-488

CARRILLO, C. D., E. TABOADA, J. H. NASH, P. LANTHIER, J. KELLY, P. C. LAU, R. VERHULP, O. MYKYTCZUK, J. SY, W. A. FINDLAY, K. AMOAKO, S. GOMIS, P.

WILLSON, J. W. AUSTIN, A. POTTER, L. BABIUK, B. ALLAN u. C. M. SZYMANSKI (2004):

Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA.

J. Biol. Chem. 279 (19), 20327-20338

CARVALHO, C. M., B. W. GANNON, D. E. HALFHIDE, S. B. SANTOS, C. M. HAYES, J. M. ROE u. J. AZEREDO (2010):

The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens.

BMC Microbiol. 10 232

CONNERTON, P. L., C. M. LOC CARRILLO, C. SWIFT, E. DILLON, A. SCOTT, C. E. REES, C. E. DODD, J. FROST u. I. F. CONNERTON (2004):

Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens.

Appl. Environ. Microbiol. 70 (7), 3877-3883

CONNERTON, P. L., A. R. TIMMS u. I. F. CONNERTON (2011):

Campylobacter bacteriophages and bacteriophage therapy.

J. Appl. Microbiol. 111 (2), 255-265

COWARD, C., A. J. GRANT, C. SWIFT, J. PHILP, R. TOWLER, M. HEYDARIAN, J. A. FROST u. D. J. MASKELL (2006):

Phase-variable surface structures are required for infection of *Campylobacter jejuni* by bacteriophages.

Appl. Environ. Microbiol. 72 (7), 4638-4647

CRUSHELL, E., S. HARTY, F. SHARIF u. B. BOURKE (2004):

Enteric *Campylobacter*: purging its secrets?

Pediatr. Res. 55 (1), 3-12

DAMME, K. (2010):

Faustzahlen zur Betriebswirtschaft.

in: K. DAMME und C. MÖBIUS: Geflügeljahrbuch 2011,

Ulmer K.G., Stuttgart, S. 58-59

DE BOER, P., J. A. WAGENAAR, R. P. ACHTERBERG, J. P. VAN PUTTEN, L. M. SCHOOLS u. B. DUIM (2002):

Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity in vivo.

Mol. Microbiol. 44 (2), 351-359

DINGLE, K. E., F. M. COLLES, D. R. WAREING, R. URE, A. J. FOX, F. E. BOLTON, H. J. BOOTSMA, R. J. WILLEMS, R. URWIN u. M. C. MAIDEN (2001):

Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*.

J. Clin. Microbiol. 39 (1), 14-23

EFSA (2009):

Scientific Opinion on "The use and mode of action of bacteriophages in food production".

EFSA Journal 2 (26), 1076

EFSA (2010):

Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates.

EFSA Journal 8 (3), 1503

EFSA (2011):

Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain.

EFSA Journal 9 (4), 2105

EFSA (2013):

The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011.

EFSA Journal 11 (3), 3129

EL-SHIBINY, A., P. L. CONNERTON u. I. F. CONNERTON (2005):

Enumeration and diversity of *Campylobacters* and bacteriophages isolated during the rearing cycles of free-range and organic chickens.

Appl. Environ. Microbiol. 71 (3), 1259-1266

EL-SHIBINY, A., A. SCOTT, A. TIMMS, Y. METAWEA, P. CONNERTON u. I. CONNERTON (2009):

Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens.

J. Food Prot. 72 (4), 733-740

EVANS, S. J. u. A. R. SAYERS (2000):

A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain.

Prev. Vet. Med. 46 (3), 209-223

FISCHER, S., S. KITTLER, G. KLEIN u. G. GLÜNDER (2013)

Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance.

PLoS ONE 8 doi: 10.1371/journal.pone.0078543.

GAYNOR, E. C., S. CAWTHRAW, G. MANNING, J. K. MACKICHAN, S. FALKOW u. D. G. NEWELL (2004):

The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes.

J. Bacteriol. 186 (2), 503-517

GOODRIDGE, L. D. u. S. ABEDON (2003):

Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry.
Soc. Ind. Microbiol. News 53 254-262

GOODRIDGE, L. D. u. B. BISHA (2011):

Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods.
Bacteriophage 1 (3), 130-137

GRIPP, E., D. HLAHLA, X. DIDELOT, F. KOPS, S. MAURISCHAT, K. TEDIN, T. ALTER, L. ELLERBROEK, K. SCHREIBER, D. SCHOMBURG, T. JANSSEN, P. BARTHOLOMAUS, D. HOFREUTER, S. WOLTEMATE, M. UHR, B. BRENNKE, P. GRUNING, G. GERLACH, L. WIELER, S. SUERBAUM u. C. JOSENHANS (2011):
Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle.
BMC Genomics 12 584

GUERRY, P., R. A. ALM, M. E. POWER, S. M. LOGAN u. T. J. TRUST (1991):

Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility.
J. Bacteriol. 173 (15), 4757-4764

HAGENS, S. u. M. J. LOESSNER (2010):

Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations.
Curr. Pharm. Biotechnol. 11 (1), 58-68

HENDRIXSON, D. R. u. V. J. DIRITA (2004):

Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract.
Mol. Microbiol. 52 (2), 471-484

HERMANS, D., K. VAN DEUN, A. MARTEL, F. VAN IMMERSEEL, W. MESSENS, M. HEYNDRIKX, F. HAESEBROUCK u. F. PASMANS (2011):

Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut.
Vet. Res. 42 (1), 82

HERMANS, D., F. PASMANS, W. MESSENS, A. MARTEL, F. VAN IMMERSEEL, G. RASSCHAERT, M. HEYNDRIKX, K. VAN DEUN u. F. HAESEBROUCK (2012):

Poultry as a host for the zoonotic pathogen *Campylobacter jejuni*.
Vector Borne Zoonotic Dis. 12 (2), 89-98

HIRSCH, K. (2010)

Entwicklung von Minimierungsstrategien für *Campylobacter* im Geflügel durch Anwendung von Bakteriophagen.

Hannover, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, doctoral thesis.

HOFREUTER, D., V. NOVIK u. J. E. GALAN (2008):

Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization.
Cell Host Microbe 4 (5), 425-433

HOLST SORENSEN, M. C., L. B. VAN ALPHEN, C. FODOR, S. M. CROWLEY, B. B. CHRISTENSEN, C. M. SZYMANSKI u. L. BRONSTED (2012):
Phase variable expression of capsular polysaccharide modifications allows *Campylobacter jejuni* to avoid bacteriophage infection in chickens.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 2 11

HYMAN, P. u. S. T. ABEDON (2010):
Bacteriophage host range and bacterial resistance.
Adv. Appl. Microbiol. 70 217-248

JANEZ, N. u. C. LOC-CARRILLO (2013):
Use of phages to control *Campylobacter* spp.
J. Microbiol. Methods 95 (1), 68-75

KITTLER, S., S. FISCHER, A. ABDULMAWJOOD, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2013):
Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks.
Appl. Environ. Microbiol. 79 (23), 7525-7533

KITTLER, S., S. FISCHER, A. ABDULMAWJOOD, G. GLÜNDER u. G. KLEIN (2014)
Colonisation of a phage susceptible *Campylobacter jejuni* population in two phage positive broiler flocks.
PLoS ONE 9: doi:10.1371/journal.pone.0094782.

LANGEN, M. (2008)
Phylogenetische Charakterisierung von *Campylobacter*-Isolaten aus der Geflügelschlachtung.
Hannover, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, doctoral thesis.

LOC CARRILLO, C., R. J. ATTERBURY, A. EL-SHIBINY, P. L. CONNERTON, E. DILLON, A. SCOTT u. I. F. CONNERTON (2005):
Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens.
Appl. Environ. Microbiol. 71 (11), 6554-6563

LOUWEN, R., D. HORST-KREFT, A. G. DE BOER, L. VAN DER GRAAF, G. DE KNEGT, M. HAMERSMA, A. P. HEIKEMA, A. R. TIMMS, B. C. JACOBS, J. A. WAGENAAR, H. P. ENDTZ, J. VAN DER OOST, J. M. WELLS, E. E. NIEUWENHUIS, A. H. VAN VLIET, P. T. WILLEMSEN, P. VAN BAARLEN u. A. VAN BELKUM (2013):
A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barre syndrome.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 32 (2), 207-226

- LOUWEN, R. u. P. VAN BAARLEN (2013):
Are bacteriophage defence and virulence two sides of the same coin in *Campylobacter jejuni*?
Biochem. Soc. Trans. 41 (6), 1475-1481
- MERTINS, S., B. J. ALLAN, H. G. TOWNSEND, W. KOSTER u. A. A. POTTER (2013):
Role of motAB in adherence and internalization in polarized Caco-2 cells and in cecal colonization of *Campylobacter jejuni*.
Avian Dis. 57 (1), 116-122
- NACHAMKIN, I., B. M. ALLOS u. T. HO (1998):
Campylobacter species and Guillain-Barre syndrome.
Clin. Microbiol. Rev. 11 (3), 555-567
- NEWELL, D. G. u. C. FEARNLEY (2003):
Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens.
Appl. Environ. Microbiol. 69 (8), 4343-4351
- NEWELL, D. G., K. T. ELVERS, D. DOPFER, I. HANSSON, P. JONES, S. JAMES, J. GITTINS, N. J. STERN, R. DAVIES, I. CONNERTON, D. PEARSON, G. SALVAT u. V. M. ALLEN (2011):
Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms.
Appl. Environ. Microbiol. 77 (24), 8605-8614
- NOVIK, V., D. HOFREUTER u. J. E. GALAN (2010):
Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its interaction with epithelial cells.
Infect. Immun. 78 (8), 3540-3553
- O'FLYNN, G., R. P. ROSS, G. F. FITZGERALD u. A. COFFEY (2004):
Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7.
Appl. Environ. Microbiol. 70 (6), 3417-3424
- RATHBUN, K. M., J. E. HALL u. S. A. THOMPSON (2009):
Cj0596 is a periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerase involved in *Campylobacter jejuni* motility, invasion, and colonization.
BMC Microbiol. 9 160
- SCOTT, A. E., A. R. TIMMS, P. L. CONNERTON, A. EL-SHIBINY u. I. F. CONNERTON (2007a):
Bacteriophage influence *Campylobacter jejuni* types populating broiler chickens.
Environ. Microbiol. 9 (9), 2341-2353

SCOTT, A. E., A. R. TIMMS, P. L. CONNERTON, C. LOC CARRILLO, K. ADZFA RADZUM u. I. F. CONNERTON (2007b):

Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS Path.* 3 (8), e119

SELBITZ, H.-J. (2007):

Campylobacter.

in: A. MAYR: Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart, S. 404-408

SIRINGAN, P., P. L. CONNERTON, R. J. PAYNE u. I. F. CONNERTON (2011):

Bacteriophage-Mediated Dispersal of *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (10), 3320-3326

SORENSEN, M. C., L. B. VAN ALPHEN, A. HARBOE, J. LI, B. B. CHRISTENSEN, C. M. SZYMANSKI u. L. BRONDSTED (2011):

Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168.

J. Bacteriol. 193 (23), 6742-6749

STERN, N. J., P. FEDORKA-CRAY, J. S. BAILEY, N. A. COX, S. E. CRAVEN, K. L. HIETT, M. T. MUSGROVE, S. LADELY, D. COSBY u. G. C. MEAD (2001):

Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations.

J. Food Prot. 64 (11), 1705-1710

TABOADA, E. N., J. M. MACKINNON, C. C. LUEBBERT, V. P. GANNON, J. H. NASH u. K. RAHN (2008):

Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*.

BMC Evol. Biol. 8 229

TANJI, Y., T. SHIMADA, M. YOICHI, K. MIYANAGA, K. HORI u. H. UNNO (2004):

Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 64 (2), 270-274

TATE, S. S. u. A. MEISTER (1981):

Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects.

Mol. Cell. Biochem. 39 357-368

VAN GERWE, T., J. K. MIFLIN, J. M. TEMPLETON, A. BOUMA, J. A. WAGENAAR, W. F. JACOBS-REITSMA, A. STEGEMAN u. D. KLINKENBERG (2009):

Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks.

Appl. Environ. Microbiol. 75 (3), 625-628

WAGENAAR, J. A., M. A. VAN BERGEN, M. A. MUELLER, T. M. WASSENAAR u. R. M. CARLTON (2005):

Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers.
Vet. Microbiol. 109 (3-4), 275-283

WASSENAAR, T. M., B. A. VAN DER ZEIJST, R. AYLING u. D. G. NEWELL (1993):
Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression.

J. Gen. Microbiol. 139 Pt 6 1171-1175

WICHMANN-SCHAUER, H., J. KOCH, M. HARTUNG, S. ROTH, K. STARK, A. KASBOHRER, K. LORENZ u. D. WERBER (2009):

Intersectoral collaboration of institutions in Germany and Europe in the field of food-borne zoonoses.

Bundesgesundheitsblatt 52 (2), 157-167

YAO, R., D. H. BURR, P. DOIG, T. J. TRUST, H. NIU u. P. GUERRY (1994):

Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells.

Mol. Microbiol. 14 (5), 883-893

YOUNG, K. T., L. M. DAVIS u. V. J. DIRITA (2007):

Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis.

Nat. Rev. Microbiol. 5 (9), 665-679

8. Anhang

Tabelle 1 *Campylobacter*-Nachweis im Vorversuch und in den Feldversuchen an unterschiedlichen Tagen nach der Phagenapplikation

Proben		log ₁₀ KbE <i>Campylobacter</i> /g Kot, bei Schlachthofproben Blinddarminhalt				Standard- Abweichung
Versuch Gruppe	d.p.a	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	
VV	1	0,0	6,7	5,4	4,1	2,7
	3	4,4	7,0	5,6	5,7	1,0
	7	2,9	5,5	4,8	4,7	0,7
	14	0,0	5,5	4,7	4,4	1,5
	21	3,0	5,8	4,6	4,5	0,7
Versuch	28	0,0	5,4	4,6	4,3	1,5
	1	0,0	7,8	5,7	4,6	3,1
	3	0,0	9,2	8,2	7,4	2,6
	7	5,8	9,4	6,9	7,2	1,2
	14	5,0	9,4	7,3	7,0	1,3
Kontrolle	21	3,7	8,2	7,0	6,9	1,3
	28	0,0	8,1	4,7	4,5	2,7
	0	0,0	4,9	3,3	2,4	1,9
	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,0	5,6	4,6	3,7	2,2
FV1	0	0,0	5,7	0,0	1,3	2,1
	1	0,0	5,6	3,7	2,6	2,5
	6	5,2	8,2	7,1	6,9	1,1
Versuch	0	0,0	5,5	4,1	3,1	2,4
	1	2,0	6,3	5,1	4,5	1,3
	2	0,0	6,5	4,8	3,4	2,7
	4	0,0	6,9	5,3	4,9	2,1
	6	4,6	7,0	5,6	5,7	0,8
Kontrolle	0	0,0	6,5	5,0	4,6	1,9
	1	0,0	6,1	5,5	4,8	1,9
	2	3,2	7,0	5,1	5,0	1,2
	4	0,0	7,0	5,0	4,4	2,3
	6	0,0	7,0	5,8	4,5	2,8
FV2	0	0,0	4,8	0,0	0,5	1,6
	1	0,0	6,9	5,3	4,5	2,7
	4	0,0	6,9	5,3	4,4	2,6
	7	5,3	7,6	6,5	6,4	0,8
	0	0,0	5,5	4,0	2,6	2,6
FV3	1	0,0	7,3	5,9	5,5	2,1

Kontrolle	4	4,9	8,1	6,2	6,2	1,1
	7	3,0	6,1	4,3	4,4	1,1

VV: Vorversuch (n=11 je Gruppe und Zeitpunkt)

FV: Feldversuch (n=9 je Gruppe und Zeitpunkt)

d.p.a.: days post application, Tage nach der Phagenapplikation

Tabelle 2 Bakteriophagen-Nachweis im Vorversuch und in den Feldversuchen an unterschiedlichen Tagen nach der Phagenapplikation

Proben		log ₁₀ PbE Bakteriophagen/g Kot, bei Schlachthofproben PbE/g Blinddarminhalt				Standard- abweichung
Versuch Gruppe	d.p.a.	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	
VV	1	0,0	6,2	4,5	3,6	2,5
	3	0,0	6,0	3,0	3,0	2,2
Versuch	7	0,0	5,5	0,0	1,9	2,3
	14	3,4	5,5	4,2	4,4	0,6
	21	0,0	5,6	3,5	3,4	1,4
	28	0,0	3,7	1,7	1,5	1,3
FV1	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Versuch	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,0	2,1	0,0	0,8	1,0
FV2	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Versuch	1	0,0	2,0	0,2	0,4	0,7
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0	0,5	0,0	0,1	0,2
	6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
FV3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Versuch	1	0,0	1,7	0,0	0,4	0,8
	4	0,0	4,9	2,9	2,7	1,6
	7	0,3	7,3	6,0	5,3	2,2
	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Kontrolle	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0	4,5	3,1	2,7	1,4
	7	0,0	5,6	3,9	3,2	2,0

VV: Vorversuch (n=11 je Gruppe und Zeitpunkt)

FV: Feldversuch (n=9 je Gruppe und Zeitpunkt)

d.p.a.: days post application, Tage nach der Phagenapplikation

Tabelle 3 Anzahl der Isolate aus den einzelnen Feldversuchen (FV), die weiterführend untersucht wurden

Herkunft <i>Campylobacter</i> Isolate	Anzahl Isolate Untersuchung				
Feldversuch	MLST	Biotyp	GGT	Phagen	Motilität
FV1	3	87	-	3	-
FV2	4	154	-	4	-
FV3	18	171	668	668	668

d.p.a.: day post application, Tage nach der Phagenapplikation

MLST: Multilocus sequence typing

GGT: Gamma-Glutamyl-Transferase-Aktivität

Phagen: Phagen-Empfänglichkeit

Tabelle 4 Ergebnisse der MLST-Analyse

		Isolat	<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>uncA</i>	ST
FV1	K	1-021	8	28	4	243	23	29	35	4819
	V	1-101	8	28	4	243	23	29	35	4819
		1-523	8	28	4	243	23	29	35	4819
FV2	K	2-021	7	17	2	15	23	3	12	905
		2-813	7	17	2	15	23	3	12	51
	V	2-101	2	15	4	3	154	25	35	51
		2-901	7	17	2	15	23	3	12	51
FV3	K	3-003	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-013	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-005	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-032	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-058	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-714	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-721	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-722	2	15	4	64	74	25	23	4755
	3-791	2	15	4	64	74	25	23	4755	
	V	3-554	22	15	4	64	23	25	23	6836
		3-102	22	15	4	64	23	25	23	6836
		3-827	22	15	4	64	23	25	23	6836
		3-381	22	15	4	64	23	25	23	6836
3-353		2	15	4	64	74	25	23	4755	
		3-310	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-840	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-891	2	15	4	64	74	25	23	4755
		3-540	2	15	4	64	74	25	23	4755

FV: Feldversuch; K Kontrollgruppe, V Versuchsgruppe

ST: Sequenz-Typ

Tabelle 5 Ergebnisse der Biotypisierung

	d.p.a.	Kontrolle		Versuchsgruppe	
		Biotyp 1	Biotyp 2	Biotyp 1	Biotyp 2
FV1	0	2	20	2	20
	1	-	-	-	-
	6	6	16	7	15
FV2	0	13	9	0	22
	1	-	-	20	2
	2	-	-	21	1
	4	-	-	21	1
	6	11	11	22	0
FV3	0	10	12	15	0
	1	3	19	21	2
	4	1	21	16	7
	6	2	20	2	20

FV: Feldversuch

d.p.a.: days post applikation, Tage nach der Phagenapplikation

- : nicht untersucht

Tabelle 6 Ergebnisse aus den weiterführenden Untersuchungen; Isolate aus Feldversuch 3 zusammengefasst nach Proben

Herkunft Probe	Probe Nr.	Anzahl Isolate	GGT-		Phagen-		Mittelwert Motilität (mm)	
			Aktivität (Isolate)		Empfänglichkeit (Isolate)			
								+
0 d.p.a.	1	20	17	03	17	03	3,5	
	2	19	17	02	19	00	4,8	
	Kontrolle	3	20	20	00	19	01	4,0
		4	20	20	00	19	01	4,5
		5	17	17	00	17	00	5,3
Versuchsgruppe	6	15	00	15	00	15	5,9	
1 d.p.a.	7	13	13	00	13	00	4,2	
	8	14	14	00	14	00	4,1	
	9	12	12	00	12	00	3,8	
	Kontrolle	10	12	11	01	12	00	3,3
		11	12	11	01	12	00	3,3
		12	12	11	01	12	00	3,8
		13	11	09	02	11	00	4,1
		14	12	11	01	12	00	4,7
Versuchsgruppe	15	07	00	07	00	07	2,4	
	16	02	00	02	00	02	2,5	
	17	21	00	21	00	21	2,8	
	18	17	00	17	00	17	2,8	
	19	20	03	17	03	17	2,9	
	20	14	00	14	00	14	2,7	
	21	19	01	18	00	19	3,6	
4 d.p.a.	22	12	12	00	12	00	3,8	
	23	11	11	00	11	00	3,8	
	24	11	11	00	11	00	4,1	
	25	11	11	00	11	00	4,2	
	Kontrolle	26	11	11	00	11	00	3,1
		27	11	11	00	11	00	3,1
		28	11	11	00	11	00	3,8
		29	10	10	00	10	00	4,3
		30	12	12	00	12	00	3,8
	Versuchsgruppe	31	09	04	05	04	05	2,7
32		20	18	02	18	02	3,6	

	33	16	14	02	15	01	4,6
	34	16	06	10	05	11	3,2
	35	15	08	07	05	10	4,3
	36	16	04	12	3	13	2,8
	37	05	03	02	03	02	3,0
7 d.p.a.	38	11	10	01	10	01	3,9
	39	11	10	01	11	00	3,7
	40	11	09	02	08	03	3,3
	41	11	10	01	09	02	3,2
Kontrolle	42	08	06	02	04	04	3,5
	43	09	07	02	09	00	4,3
	44	11	08	03	08	03	3,7
	45	11	09	02	03	08	3,5
	46	11	10	01	10	01	3,9
	47	07	07	00	06	01	3,9
	48	11	10	01	11	00	2,3
	49	05	04	01	04	01	3,0
Versuchsgruppe	50	10	09	01	08	02	2,5
	51	03	02	01	03	00	2,7
	52	09	09	00	08	01	2,4
	53	08	05	03	07	01	2,9
	54	06	06	00	06	00	4,2
	55	08	05	03	05	01	3,5

GGT: Gamma Glutamyl Transferase

d.p.a.: days post applicaion, Tage nach der Phagenapplikation

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Univ. Prof. Dr. med. vet. Günter Klein und PD Dr. med. vet. Glünder für die Überlassung des interessanten Themas und die Freiheit, dieses selbstständig bearbeiten zu können. Prof. Dr. Klein danke ich für die immer verlässliche Betreuung und die zahlreichen hilfreichen und zielführenden Besprechungen in seiner knapp bemessenen Zeit. PD Dr. Glünder danke ich vor allem für die anregenden Gespräche und hilfreichen Korrekturen.

Ich danke den Projektpartnern für die Unterstützung bei der Organisation und Durchführung der Feldversuche und für die Förderung des Projekts. Dr. med. vet. Anke Große-Herrenthey danke ich für die Anleitung bei der Durchführung der MALDI-TOF-Analyse.

Frau Prof. Dr. agr. Viktoria Atanassova danke ich für die Möglichkeit, die Versuche der vorliegenden Arbeit im mikrobiologischen Labor des Instituts für Lebensmittelqualität und –sicherheit durchzuführen.

Dr. med. vet. habil. Abdul Abdulmawjood möchte ich für die Hilfe beim Multi Locus Sequence Typing und bei Fragen zu den Veröffentlichungen sowie für die hilfreichen Korrekturen danken.

Den technischen Mitarbeitern Birgit Führung, Ina Vasen, Sabine Korff, Andreas Schridde, Silke Schlote-Kohne, Rouwen Stucke, Mike Schiwiek und Hilke Bartels danke ich herzlich für die exzellente Bearbeitung der Proben.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Martin Beyerbach für die Beratung zu den statistischen Auswertungen und die immerwährende Bereitschaft und Geduld, meine Fragen zu beantworten.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mit-Doktorandinnen und Kolleginnen und Kollegen. Meiner lieben Kollegin Dr. med. vet. Wiebke Jansen danke ich ganz besonders für jeden Rat und die tatkräftige Unterstützung bei den Feldversuchen

sowie eine herzliche Arbeitsatmosphäre. Dr. med. vet. Samuel Fischer möchte ich für die produktive Zusammenarbeit danken.

Meinen Eltern danke ich von Herzen dafür, dass sie mich immer unterstützt und mir das Studium ermöglicht haben.

Martin, Dir danke ich einfach für alles, aber vor allem für die immerwährende Bereitschaft, Dich in meine Fragen einzudenken und sie mit mir zu diskutieren.

ISBN 978-3-86345-208-7



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvf.de · Internet: www.dvf.de**