

---

**Untersuchung zur immunologischen Bedeutung  
des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**Stefanie Barth**



Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

# **Untersuchung zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Stefanie Barth**  
Tierärztin aus Erlangen

Gießen, 2003

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind  
PD Dr. P. Becher

Tag der Disputation: 04. November 2003

*Meinen Eltern*

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bauerfeind, R., S. Barth und G. Baljer.  
Plasmidkodierte Virulenzfaktoren von Salmonellen und ihre Eignung für die Serodiagnostik.  
23. DVG-Kongreß, Bad-Nauheim, 13. bis 16. April 1999; ISBN: 3-9230511-69-X.

S. Barth, R. Weiß und R. Bauerfeind.  
Untersuchungen über die Eignung des Virulenzfaktors „SpvD“ zum Testantigen in der  
Salmonellen-Serodiagnostik bei Tieren.  
24. DVG-Kongreß, Bad-Nauheim, 4. - 7. April 2001; ISBN 3-935747-01-2.

Bauerfeind, R., S. Barth, R. Weiß und G. Baljer.  
Häufigkeit des *Salmonella*-Plasmid-Virulence-Gens "*spvD*" bei *Salmonella*-Stämmen von  
Tieren.  
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. 2001. Band 108: Seiten 243-245.

Bauerfeind, R., S. Barth, R. Weiß and G. Baljer.  
Sequence polymorphism of the *Salmonella* plasmid virulence factor D (SpvD) in *Salmonella*  
*enterica* isolates of animal origin.  
Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift. 2001. Band 114: Seiten 404-408.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der  
**Doktorandenförderung des Geschäftsbereiches Tiergesundheit der BAYER AG.**

## Inhaltsverzeichnis

	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Gattung <i>Salmonella</i> - Taxonomische Stellung und Einteilung</b> ....	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Die Virulenzplasmide der Salmonellen</b> .....	<b>4</b>
2.2.1	Begriffsbestimmung .....	4
2.2.2	Vorkommen und Häufigkeit .....	4
2.2.3	Genetische Organisation .....	6
2.2.4	Replikation .....	7
2.2.4.1	Plasmidinkompatibilität .....	9
2.2.4.2	Plasmidstabilität .....	10
2.2.4.3	Konjugation und Mobilisation .....	11
2.2.5	Bedeutung des Virulenzplasmides für die Virulenz von Salmonellen .....	12
2.2.6	Plasmidkodierte Virulenzfaktoren und ihre Eigenschaften.....	14
2.2.6.1	<i>Salmonella</i> plasmid virulence ( <i>spv</i> )-Proteine .....	14
2.2.6.2	„Plasmid encoded fimbriae“ (Pef) .....	27
2.2.6.3	„Fae-like“-Fimbrien .....	29
2.2.6.4	Typ-1-homologe Fimbrien .....	29
2.2.6.5	Faktoren der Komplementresistenz .....	30
2.2.6.6	Mig-5 .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>32</b>
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Puffer .....	32
3.1.2	Bakterienstämme .....	32
3.1.3	Plasmide .....	34
3.1.4	Impfstoff .....	34
3.1.5	Tiere .....	34
3.1.6	Blutproben .....	35

---

<b>3.2</b>	<b>Bakteriologische Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Anzucht von Bakterien .....	35
3.2.2	Salmonellen-Nachweisverfahren.....	36
3.2.3	Keimzahlbestimmung .....	37
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Präparation von DNS .....	37
3.3.2	DNS-Bestimmung.....	38
3.3.3	Restriktion von DNS .....	39
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
3.3.5	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.3.6	DNS-DNS-Hybridisierung .....	42
3.3.7	DNS-Klonierung .....	43
3.3.8	DNS-Sequenzierung.....	44
<b>3.4</b>	<b>Proteinanalytische Methoden.....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Proteinbestimmung .....	45
3.4.2	SDS-PAGE.....	45
3.4.3	Löslichkeitsanalyse von <i>E.coli</i> -Proteinen.....	46
3.4.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix.....	46
3.4.5	Entsalzung von Proteinfractionen.....	46
<b>3.5</b>	<b>Serologische Methoden .....</b>	<b>47</b>
3.5.1	Konjugate .....	47
3.5.2	Immunoblot / Westernblot.....	47
3.5.3	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	48
<b>3.6</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>50</b>
3.6.1	Herstellung eines Immunsерums gegen rSpvD-His.....	50
3.6.2	Mausinfektionsmodell .....	50
<b>3.7</b>	<b>Datenhaltung und Auswertung .....</b>	<b>52</b>
3.7.1	Bilddokumentation und Auswertung .....	52
3.7.2	Auswertung von DNS- und Aminosäure-Sequenzdaten.....	52
3.7.3	Statistische Auswertung .....	52

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
4.1	<b>Verbreitung und Häufigkeit des <i>spvD</i>-Gens bei <i>Salmonella enterica</i>-Isolaten</b> .....	<b>53</b>
4.2	<b>Variabilität der Primärstruktur des SpvD</b> .....	<b>65</b>
4.2.1	Nukleotidsequenzen des <i>spvD</i> -Gens bei <i>Salmonella enterica</i> -Stämmen verschiedener Serovare und Herkunft .....	65
4.3	<b>Rekombinante Herstellung des SpvD</b> .....	<b>70</b>
4.3.1	Klonierung des <i>spvD</i> -Gens in <i>E.coli</i> K12.....	70
4.3.2	Nachweis und Optimierung der Überexpression des rekombinanten SpvD als Histidin-markiertes Fusionsprotein.....	72
4.3.3	Isolierung und Reindarstellung des rSpvD-His .....	76
4.4	<b>Untersuchungen zur Immunogenität des SpvD</b> .....	<b>79</b>
4.4.1	Immunisierungsversuch am Kaninchen .....	79
4.4.2	Humorale Immunantwort gegen SpvD bei salmonelleninfizierten BALB/c-Mäusen.....	81
4.4.3	Evaluierung eines SpvD-ELISA zur Serodiagnostik der Salmonelleninfektion beim Pferd.....	92
<b>5</b>	<b>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</b> .....	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>110</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>114</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>137</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>143</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

A.dest.	<u>A</u> qua <u>dest</u> illata
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
<i>bcf</i> -Operon	Genlocus für den <u>b</u> ovine <u>c</u> olonisation <u>f</u> actor
BgVV	<u>B</u> undesinstitut für <u>g</u> esundheitlichen <u>V</u> erbraucherschutz und <u>V</u> eterinärmedizin
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
BPLS	<u>B</u> rilliantgrün- <u>P</u> henolrot- <u>L</u> actose- <u>S</u> accharose
BZL	<u>B</u> akterienzelllysate
CcdA, -B	<u>c</u> oupled <u>c</u> ell <u>d</u> ivision, Ccd-Addiction-System
CopB	ein Bestandteil der Replikationseinheit <i>repB</i>
Crp	<u>c</u> AMP <u>r</u> eceptor <u>p</u> rotein, Regulator der <i>spv</i> -Expression
<i>crs</i>	DNS-Region mit Promotoraktivität
Da	<u>D</u> alton
Dig	<u>D</u> igoxigenin
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
dsDNS	<u>d</u> oppeltsträngige <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
DT	“ <u>d</u> efinitive <u>t</u> ype” (syn. Phagentyp, Lysotyp)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin- <u>T</u> etraazetat-Natriumsalz
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
<i>fae</i> -Locus	Genlocus zur F4- Fimbriensynthese bei <i>Escherichia coli</i>
<i>fim</i> -Locus	Genlocus zur Typ-1- Fimbriensynthese bei <i>Escherichia coli</i>
<i>finO</i>	Regulation der Expression der <i>tra</i> -Region
h	Stunde
His	<u>H</u> istidin
H-NS	histone-like protein, Regulator der <i>spv</i> -Expression
i.m.	<u>i</u> nter <u>m</u> uskulär
i.p.	<u>i</u> nter <u>p</u> eritoneal
i.v.	<u>i</u> nter <u>v</u> enös
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
Ihf	<u>i</u> ntegration <u>h</u> ost <u>f</u> actor, Regulator der <i>spv</i> -Expression
IHIT	<u>I</u> nstitut für <u>H</u> ygiene und <u>I</u> nfektionskrankheiten der <u>T</u> iere
Inc	Inkompatibilitätsdeterminante
<i>incR</i>	Bestandteil des Plasmidsegregationssystems
IPTG	<u>I</u> sopropyl- $\beta$ -D- <u>t</u> hiogalactosid
<i>IS630</i>	<u>I</u> nsertionselement <u>630</u>
J	<u>J</u> oule
KbE	<u>k</u> olonie <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten

kbp	<u>K</u> ilob <u>a</u> sen <u>p</u> aare
kDa	<u>K</u> ilod <u>a</u> lton
KG	<u>K</u> ör <u>p</u> er <u>g</u> ewicht
LacZ	$\beta$ -Galactosidase
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LD <sub>50</sub>	<u>L</u> etale <u>D</u> osis für 50 % der Versuchspopulation
LPS	<u>L</u> ipopol <u>y</u> saccharid
Lrp	l <u>e</u> ucin-responsive <u>r</u> egulatory <u>p</u> rotein, Regulator der <i>spv</i> -Expression
LysR	Familie von Transkriptionsregulatoren
<i>mba</i> -Gene	<u>m</u> ouse <u>b</u> acteremia region, früher für <i>spv</i> -Gene
MDa	<u>M</u> egad <u>a</u> lton
MH	<u>M</u> üller- <u>H</u> inton
Mig-5	<u>m</u> acrophage <u>i</u> nducible <u>g</u> ene, Carboanhydrase
min	<u>M</u> inute
<i>mka</i> -Gene	<u>m</u> ouse <u>k</u> illing <u>a</u> gent, früher für <i>spv</i> -Gene
<i>mkf</i> -Gene	<u>m</u> ouse <u>k</u> illing <u>f</u> actor, früher für <i>spv</i> -Gene
MM	<u>M</u> olekulare <u>M</u> asse
mRNS	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonukleinsäure
mtKI	<u>m</u> ittlerer <u>t</u> äglicher <u>k</u> linischer <u>I</u> ndex während der Dauer der Erkrankung
n	Stichprobenumfang
n.t.	nicht getestet
Nuc	Endonuklease
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
OPD	<u>O</u> rtho- <u>P</u> henylen- <u>D</u> iphosphat
<i>orfE</i>	Leserahmen stromabwärts des <i>spv</i> -Locus
<i>ori</i>	<u>o</u> ri <u>g</u> in, Startpunkt der Replikation
PA	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> el
<i>pap</i> -Locus	Genlocus zur Pap-Fimbriensynthese bei <i>Escherichia coli</i>
<i>parA</i> , - <i>B</i> , - <i>S</i>	<u>p</u> artition region, Plasmidsegregationssystem
PBS	<u>P</u> hosphat- <u>B</u> uffered- <u>S</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaktion
<i>pefA</i> , - <i>B</i> , - <i>C</i> , - <i>D</i> , - <i>I</i>	<u>p</u> lasmid <u>e</u> ncoded <u>f</u> imbriae, Genlocus zur Pef-Fimbriensynthese
PhoP/PhoQ	Zwei-Komponenten-Regulationssystem
PMSF	<u>P</u> henyl- <u>M</u> ethyl- <u>S</u> ulfonyl- <u>F</u> luorid
PsiA, -B	<u>p</u> lasmid <u>s</u> OS <u>i</u> nhibition Proteine
PT	<u>P</u> hagent <u>yp</u>
r	Korrelationskoeffizient
Rck	<u>r</u> esistance to <u>c</u> omplement <u>k</u> illing, Äußere-Membran-Protein
RepA	Initiationsprotein der Replikation
<i>repB</i> , - <i>C</i>	Replikationseinheiten (Replikons)

RKI	<u>R</u> o <u>b</u> ert- <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut
RlgA	Resolvase
RpoS	$\sigma$ -Untereinheit der RNS-Polymerase, Regulator der <i>spv</i> -Expression
Rsd	<u>R</u> esolvase von <u>S.</u> <u>D</u> ublin
<i>rsk</i>	<u>r</u> educed <u>s</u> erum <u>k</u> illing, DNS-Region die Serumresistenz vermittelt
rSpvD-His	<u>r</u> ekombinantes <u>S</u> pv <u>D</u> -Fusionsprotein mit <u>H</u> istidin-Marker
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S.	<u>S</u> almonella
S. Aeq	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Abortusequi
S. Chs	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Choleraesuis
S. Dub	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Dublin
S. Ent	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Enteritidis
S. Gall	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Gallinarum
S. Pull	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Pullorum
S. Tm	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Typhimurium
S. TmCop	<u>S</u> almonella <u>e</u> nterica Serovar Typhimurium variatio Copenhagen
s.c.	subkutan
SamA, -B	<u>S</u> almonella <u>m</u> utagenesis, Proteine zur DNS-Reparatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	<u>S</u> ekunde
sKI	<u>s</u> ummierter <u>k</u> linischer <u>I</u> ndex
SpvR-, A, -B, -C, -D	<u>S</u> almonella <u>p</u> lasmid <u>v</u> irulence-Proteine
<i>srgA</i> , -B, -C	<u>S</u> diA <u>r</u> egulated <u>g</u> enes
SsbB	<u>s</u> ingle- <u>s</u> trand <u>b</u> inding Protein, Helix-destabilisierend
SSC	<u>S</u> aline- <u>S</u> odium- <u>C</u> itrat
ssDNS	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>tap</i>	an der Plasmidreplikation beteiligter DNS-Abschnitt
Tca, Tcc, Tcd	Toxine bei <i>Photobacterium luminescens</i>
TlpA	autoregulatorisches coiled-coil-Protein
<i>tra</i> -Region	Gene der Transferregion, an F-Pili-Synthese beteiligt
TraT	Serumresistenz-Faktor
<i>trb</i> -Region	Gene der Transferregion
U/min	Umdrehungen pro Minute
VA	<u>V</u> eterinä <u>r</u> am <u>t</u>
<i>vagC</i> , -D	<u>v</u> irulence <u>a</u> ssociated <u>g</u> enes von S. Dublin
var.	<u>v</u> ariatio
<i>vir</i> -Gene	<u>v</u> irulence region, früher für <i>spv</i> -Gene
Vol	<u>V</u> olumen
<i>vsd</i> -Gene	<u>v</u> irulence related genes of <u>S.</u> <u>D</u> ublin, früher für <i>spv</i> -Gene

## 1 EINLEITUNG

In den meisten Ländern der Erde gehören Salmonellen zu den häufigsten Infektionserregern bei Mensch und Tier. In Deutschland stehen Salmonellen mit einer Inzidenz von ca. 100 pro 100.000 Einwohner und Jahr derzeit an erster Stelle der mittels Meldepflicht erfaßten Ursachen der Enteritis infectiosa des Menschen (**13**). Meist haben Salmonelleninfektionen des Menschen ihren Ursprung bei infizierten Nutz- und Heimtieren. Daher kommt der Bekämpfung von Salmonellen bei lebensmittelliefernden Tieren eine zentrale Bedeutung für den gesundheitlichen Verbraucherschutz zu. Zum anderen sind Salmonellen auch bei vielen Wirbeltieren, insbesondere bei den Jungtieren, Ursache schwerer Erkrankungen, die der veterinärmedizinischen Behandlung und Prophylaxe bedürfen (**88, 115, 226, 239, 311**).

Die serologische Identifizierung von *Salmonella*-infizierten Tieren mit nachfolgender Aussonderung positiver Reagenten und der Einsatz von Impfstoffen aus inaktivierten oder vermehrungsfähigen Keimen gehören zu den derzeit favorisierten Bekämpfungsmaßnahmen gegen Salmonellen im Nutztierbereich. Die Wirksamkeit derartiger Maßnahmen ist durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Untersuchungen hinreichend belegt. So sind für die serologische Überwachung bei Geflügel, Schweinen und Rindern Immuntests auf der Basis von Antigenpräparaten aus Bakterienzelllysaten, Lipopolysaccharid-Gemischen, Fimbrien und Flagellen erfolgreich eingesetzt worden (**19, 129, 201**). Sowohl in experimentellen Tierversuchen, als auch in Felduntersuchungen erzielten insbesondere Impfstoffe aus attenuierten Stämmen der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Choleraesuis eine gute bis sehr gute Schutzwirkung (**11, 49, 133, 190**). Gleichzeitig sind aber auch die Grenzen der derzeit vorhandenen Methoden und Impfstoffe sichtbar geworden (**19, 191, 201**). Probleme bereiten insbesondere die Antigenvielfalt der Salmonellen und deren enge Strukturverwandtschaft zu anderen Bakterienspezies der Familie Enterobacteriaceae. Antigenvielfalt und Strukturverwandtschaft führen dazu, daß mit den Nachweissystemen einerseits nicht alle Salmonellenserovare erfaßt werden können und andererseits falsch positive Testreaktionen infolge einer immunologischen Auseinandersetzung mit anderen Darmbakterien nicht immer ausgeschlossen werden können. Ferner wirken die derzeit verfügbaren Impfstoffe vorzugsweise serovarspezifisch und sind nur in sehr begrenztem Ausmaß auch gegen Infektionen durch andere Salmonellenserovare protektiv. Genuspezifische Antigene, die bei allen relevanten Vertretern der Gattung in hochkonservierter Form vorkommen, könnten die Grundlage für wesentlich zuverlässigere Tests und breiter wirksame Impfstoffe sein. In der jüngeren Vergangenheit wurden derartige Faktoren bereits identifiziert, allerdings noch selten auf ihre immunologischen Eigenschaften untersucht.

Vor wenigen Jahren wurde bei den Vertretern von mehreren *Salmonella*-Serovaren der in seiner Sequenz hochgradig konservierte *spv* (*Salmonella* plasmid *virulence*)-Locus entdeckt (102). Dieser Genlocus befindet sich auf dem sogenannten Virulenzplasmid von *Salmonella enterica* und umfaßt die fünf Gene *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* und *spvD*. Bisher konnte nur die Funktion der Proteine SpvR (transkriptioneller Regulator der Expression der *spv*-Gene) und SpvB (Mono[ADP-ribosyl]transferase) geklärt werden (82, 288). Dagegen besitzen die Genprodukte von *spvA*, *spvC* und *spvD* keine Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Organismen und sind allem Anschein nach salmonellenspezifisch. Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der Spv-Proteine legen die Hypothese nahe, daß insbesondere das Protein SpvD ein Ziel für das Immunsystem des Wirtes ist, da es offensichtlich von der Bakterienzelle nach außen abgegeben wird (78). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob SpvD als Antigen für die serologische Diagnostik der Salmonelleninfektion einsetzbar ist. Im einzelnen sollten Antworten auf die folgenden Fragen gegeben werden:

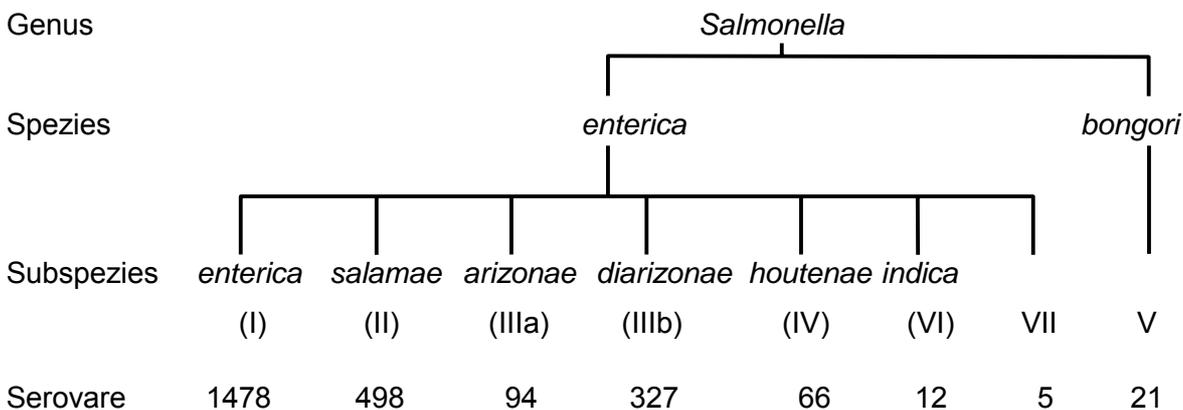
1. Wie verbreitet ist das *spvD*-Gen bei den in Deutschland derzeit bei Tieren vorkommenden Salmonellen ?
2. Wie häufig kommt *spvD* bei *Salmonella*-Serovaren vor, bei denen Virulenzplasmide beschrieben sind ?
3. Unterliegt die antigene Struktur von SpvD der Variation ?
4. Wirkt SpvD bei einer *Salmonella*-Infektion immunogen ?

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Die Gattung *Salmonella* - Taxonomische Stellung und Einteilung

Die Gattung *Salmonella* (*S.*) gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae, welche zur Gamma-Untergruppe der Proteobakterien und somit zu den Eubakterien gezählt werden (**268**). Salmonellen sind gramnegative, fakultativ anaerobe, fast ausnahmslos bewegliche, gerade Stäbchen mit einer Größe von 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm (**128, 256**).

Anhand genetischer und phänotypischer Merkmale lassen sich die Salmonellen in zwei Spezies differenzieren: *Salmonella choleraesuis* und *Salmonella bongori* (siehe **Abbildung 1; 37, 59, 67, 162, 235**). In der Fachliteratur ist der Speziesname *Salmonella choleraesuis* heute meistens durch die Bezeichnung *Salmonella enterica* ersetzt, um Verwechslungen mit dem gleichnamigen *Salmonella*-Serovar Choleraesuis vorzubeugen (**162**). Diese Namensänderung wird allerdings immer noch kontrovers diskutiert und ist nicht offiziell gültig (**79, 320**). Aus Gründen der Verständlichkeit folgt die vorliegende Arbeit jedoch der von **LE MINOR & POPOFF** vorgeschlagenen neuen Nomenklatur.



**Abbildung 1:** Einteilung des Genus *Salmonella* in Spezies und Subspezies (nach **38, 80, 229, 235**).

Die Spezies *Salmonella enterica* wird ihrerseits in sieben Subspezies unterteilt: Subspezies I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*), VI (*indica*) und VII (**38, 80**). Die weitere Differenzierung in Serovare wird serologisch entsprechend dem Kauff-

mann-White-Schema vorgenommen. Diese serologische Klassifizierung erfolgt nach dem Vorkommen spezifischer O-Antigendeterminanten im Lipopolysaccharidkomplex und H-Antigendeterminanten im Flagellin der Bakterien (256). Zur Zeit sind 2501 Serotypen (Serovare) der Gattung *Salmonella* definiert (229). Die größte Serovarvielfalt ist in der Subspezies *enterica* vorhanden.

## 2.2 Die Virulenzplasmide der Salmonellen

### 2.2.1 Begriffsbestimmung

Bei den sogenannten *Salmonella*-Virulenzplasmiden handelt es sich um relativ große, doppelsträngige, zirkuläre DNS-Moleküle, die bei bestimmten *Salmonella*-Serovaren vorkommen. Sie sind sogenannte „Low-Copy“-Plasmide, welche in bis zu drei Kopien je Bakterienzelle vorhanden sind (*S. Typhimurium*) (186, 291).

Das Vorhandensein dieser Plasmide korreliert positiv mit der Virulenz der betreffenden Stämme, weshalb sie bereits wenige Jahre nach ihrer Erstbeschreibung als Virulenzplasmide bezeichnet wurden. Das gemeinsame, charakteristische Merkmal dieser Plasmide ist der in Aufbau und Sequenz hochkonservierte „*Salmonella* plasmid *virulence*“-Locus (*spv*-Locus, siehe **Abschnitt 2.2.6.1**). Weitere gemeinsame Merkmale aller *Salmonella*-Virulenzplasmide ist die für das jeweilige Serovar typische Größe zwischen 50 und 140 kbp und der innerhalb eines Serovars weitestgehend einheitliche genetische Aufbau (siehe **Tabelle 1**). Zwischen den Serovaren gibt es, bei aller Strukturverwandtschaft, auch erhebliche Unterschiede, vor allem in der Gesamtgröße der Plasmide sowie in der Anzahl und Anordnung verschiedener Sequenzabschnitte. Virulenzplasmide wurden mittlerweile bei 14 Serovaren von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* nachgewiesen. Bemerkenswerterweise sind innerhalb dieser Serovare jeweils ein sehr hoher Prozentsatz an Stämmen Träger eines solchen Plasmides.

### 2.2.2 Vorkommen und Häufigkeit

Die *Salmonella*-Virulenzplasmide wurden in den 80er Jahren entdeckt, als man beobachtete, daß fast alle *S. Typhimurium*-Isolate ein großes Plasmid von ca. 90 kbp besaßen (9, 14, 76, 257, 259, 262, 267). Bis heute wurden *Salmonella*-Virulenzplasmide auch bei dreizehn weiteren Serovaren von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* eindeutig identifiziert (siehe **Tabelle 1**) (43, 58, 75, 91, 117, 124). Auffällig ist, daß die Virulenzplasmide insbesondere bei den sogenannten wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovaren auftreten. So wurden derartige Plasmide bei den veterinärmedizinisch relevanten wirtsadaptierten Serovaren *S. Abortus-*

equi, *S. Abortusovis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Gallinarum/Pullorum*, sowie dem humanspezifischen Serovar *S. Paratyphi C* nachgewiesen. Nur bei den wirtsadaptierten Serovaren *S. Typhisuis*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* und *S. Paratyphi B* kommen keine Virulenzplasmide vor (39, 228). *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Bovismorbificans* sind nach derzeitigem Kenntnisstand die einzigen nicht wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovare, bei denen sich *Salmonella*-Virulenzplasmide ebenfalls finden lassen. Ergebnisse aus Hybridierungsversuchen mit Gensonden, die den *spv*-Locus umspannten, legen die Vermutung nahe, daß *Salmonella*-Virulenzplasmide auch bei den Serovaren 4,12:-:-, 4,5,12:i:-, Derby und Naestved vorkommen (39, 94, 230, 251). Bei den Serovaren Agona, Anatum, Blegdam, Braenderup, Drypool, Hadar, Heidelberg, Hessarek, Indiana, Infantis, Johannesburg, Kentucky, Kottbus, London, Manhattan, Mbandaka, Montevideo, Morehead, Moscow, Newport, Ohio, Rostock, Senftenberg und Worthington sind *spv*-homologe DNS-Sequenzen im Chromosom nachgewiesen worden (147, 174, 205, 228, 312, 317, 318).

**Tabelle 1:** *Salmonella enterica*-Serovare mit Virulenzplasmid.  
(nach 7, 39, 81, 94, 228, 230, 245, 251).

Serovar	Plasmidgröße [kbp] <sup>1)</sup>	bevorzugte Wirtsspezies
Abortusequi	93	Pferd
Abortusovis	45 (68)	Schaf
Bovismorbificans	90	-
Choleraesuis	45 (110)	Schwein
Derby	93	-
Dublin	84	Rind
Enteritidis	56 (68, 84)	-
Gallinarum/Pullorum	85	Geflügel
Naestved	84	-
Paratyphi C	56	Mensch
Typhimurium	90	-
Typhimurium variatio Copenhagen	90 (110)	-
4,12:-:-	90	-
4,5,12:i:-	140	-

**Erläuterung:** 1) Bei einigen Serovaren sind Virulenzplasmide verschiedener Größe beschrieben. Die selteneren Varianten sind in Klammern gesetzt.

Bei den Serovaren Abortusovis, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum und Typhimurium weisen über 90 % der Isolate ein Virulenzplasmid in der jeweils charakteristischen Größe auf, bei den Serovaren Abortusequi und 4,5,12:i:- noch ca. 80 % der Stämme (**7, 43, 56, 64, 94, 110, 215, 318**). Manche Autoren haben Unterschiede in der Plasmid-Häufigkeit festgestellt, je nachdem aus welchem Probenmaterial die Salmonellen isoliert worden waren. So wurden aus den Organen Virulenzplasmid-positive *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium*-Stämme von an Salmonellose erkrankten Patienten zu einem deutlich höheren Prozentsatz isoliert als aus dem Kot (**86, 195**). Diese Ergebnisse konnten aber von anderen Autoren nicht bestätigt werden, da sie Virulenzplasmid-positive Salmonellen zu einem ähnlich hohen Prozentsatz sowohl aus den Organen als auch aus dem Kot isolierten (**54**).

### 2.2.3 Genetische Organisation

Aufgrund seiner molekulargenetischen Eigenschaften wird das Virulenzplasmid von *S. Typhimurium* als das phylogenetisch älteste eingestuft. Es ist das größte der *Salmonella*-Virulenzplasmide (90 kbp) und enthält Gene, die zum großen Teil auch auf den anderen Virulenzplasmiden in der gleichen Reihenfolge sowie Orientierung liegen. Die Plasmide anderer Serovare besitzen an jeweils charakteristischen Stellen Insertionen und Deletionen (**217**). Der Verwandtschaftsgrad in der Nukleotidsequenz fällt in der Reihenfolge Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis und Dublin ab (**196**). Allerdings verfügen die Virulenzplasmide der Serovare Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum einheitlich über den *oriT*, der bei den Serovaren Dublin und Choleraesuis nicht vorkommt (**217**). Andererseits konnte der *pef*-Locus nur bei Plasmiden der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Choleraesuis nachgewiesen werden, wohingegen nur die Plasmide der Serovare Dublin und Gallinarum/Pullorum den *fae*-like-Locus besitzen (**248, 318**).

Bereits in den 90er Jahren konnten mittels Hybridisierung mit ganzen Plasmiden Homologien zwischen den Virulenzplasmiden verschiedener Serovare nachgewiesen werden (**16, 228**). Später konnten **MONTENEGRO ET AL.** diese Sequenzverwandtschaft mit Heteroduplex-Analysen quantifizieren. So hybridisierten 99 % des *S. Enteritidis*- und 92 % des *S. Choleraesuis*-Virulenzplasmides mit Sequenzen des Plasmides von *S. Typhimurium*. Von dem *S. Choleraesuis*-Plasmid waren 84 % homolog zu dem von *S. Enteritidis*. Die wenigsten Gemeinsamkeiten wies das Virulenzplasmid von *S. Dublin* auf, von dem nur 42 % mit dem Plasmid von *S. Typhimurium* und sogar nur 35 % mit den Plasmiden von *S. Enteritidis* und *S. Choleraesuis* hybridisierten (**195**).

Zur Zeit liegen vollständige Nukleotidsequenzen nur von dem 49.503 bp großen Virulenzplasmid pKDSC50 von *S. Choleraesuis* Stamm RF-1 (GenBank-Eintrag AB040415, **113**) und dem 93.939 bp großen Plasmid pSLT von *S. Typhimurium* Stamm LT2 (GenBank-Eintrag

AE006471, **186**) vor. Von dem Plasmid pFM82139 von *S. Enteritidis* wurde eine Genkarte veröffentlicht, welche anhand ansequenzierter Fragmente erstellt wurde (**244**). Die Genkarten dieser drei Plasmide sind in der **Abbildung 2** wiedergegeben. Dabei wird deutlich, daß sich die Sequenzen bzw. Gene der *S. Enteritidis*- und *S. Choleraesuis*-Plasmide nahezu vollständig sowie in derselben Reihenfolge und Orientierung im Virulenzplasmid von *S. Typhimurium* wiederfinden (**113**). So besitzen alle drei *Salmonella*-Virulenzplasmide sowohl den ca. 37,5 kbp langen DNS-Abschnitt von *samA* bis *pefD*, der unter anderem den *spv*-Locus beinhaltet, als auch den ca. 2,5 kbp langen DNS-Abschnitt von *repB* bis *copB*.

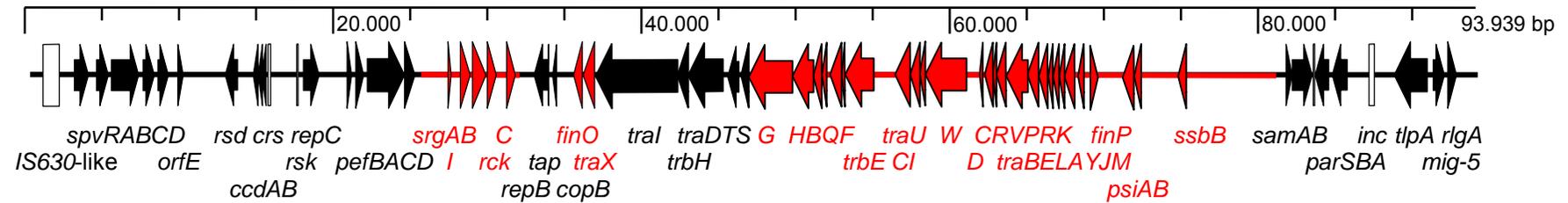
#### 2.2.4 Replikation

Bei gramnegativen Bakterien erfolgt die Plasmidreplikation in der Regel in bidirektionaler Richtung in Form einer *Theta*-Replikation. Dieser Prozeß verläuft meist zeitlich unabhängig von der Replikation der chromosomalen DNS. Daher sind auf den Plasmiden Gene lokalisiert, welche den zeitlichen Ablauf bestimmen, aber auch Gene, deren Produkte die Entstehung plasmidloser Tochterzellen vermeiden sollen (**175**). Gesteuert wird die Replikation der Plasmid-DNS von sogenannten Replikationseinheiten.

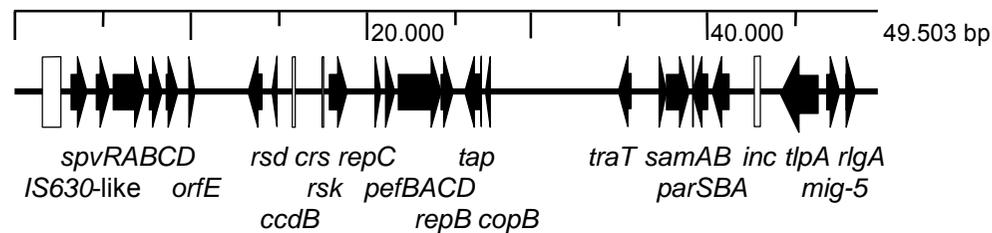
Auf den *Salmonella*-Virulenzplasmiden werden zwei an der Replikation beteiligte DNS-Regionen unterschieden: die ***repB***- und die ***repC***-Region. Beide Regionen stellen eigenständige, funktionale Replikationseinheiten (Replikons) dar. Die Virulenzplasmide der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Choleraesuis besitzen beide genannten Regionen, Virulenzplasmide der Serovare Gallinarum/Pullorum und Dublin nur die *repB*-Region (**32, 291, 292**). Trotz dieser Unterschiede besitzen die Replikationsregionen der Virulenzplasmide ein hohes Maß an Nukleotidsequenzhomologie (**60, 113, 244**). Artifiziell in einen Plasmidvektor ligiert, beschränken sowohl die *repB*- als auch die *repC*-Region des *S. Typhimurium*-Plasmides die Kopienzahl des rekombinanten Plasmides auf zwei bis drei Kopien pro *E. coli*-Zelle (**291**).

Die ***repB***-Region besitzt hohe Homologie zu den RepFIIA-Replikons der Plasmide pYVe439-80 von *Yersinia enterocolitica*, pB171 und pO157 von *E. coli* sowie pCD1 von *Yersinia pestis* und hybridisiert mit der IncFII-kodierenden Region des Plasmides R-100 von *E. coli* (**113, 291**). RepFIIA-Replikons werden durch Protein-RNS-DNS-Interaktionen reguliert. Innerhalb der *repB*-Region liegen die Gene *repA* und *copB*. RepA (33,5 MDa) ist das eigentliche Initiationsprotein der Replikation, das für den Start an dem direkt stromabwärts liegenden Replikationsstartpunkt binden muß. Die Bildung von *repA*-mRNS erfolgt über zwei Promotoren, den *copB*- und den *repA*-Promotor. Die Expression von CopB inhibiert die *repA*-Promotoraktivität, so daß vermehrt *copB*-*repA*-Transkripte gebildet werden. Die Translation der *copB*-*repA*-mRNS wird ihrerseits durch die Bindung von einem zum 5'-Terminus komplementären

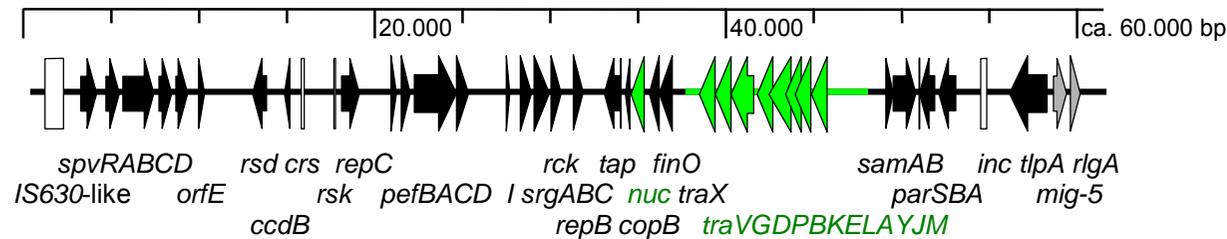
**Salmonella Typhimurium** (GenBank-Eintrag AE006471; 186)



**Salmonella Choleraesuis** (GenBank-Eintrag: AB040415; 113)



**Salmonella Enteritidis** (nach RODRÍGUEZ-PEÑA ET AL.; 244)



**Abbildung 2:** Genkarten der Virulenzplasmide von *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* und *S. Enteritidis*. Unterschiedliche Bereiche sind farblich gekennzeichnet, nicht gesicherte Gene sind grau unterlegt.

kurzen RNS-Transkript (*copA*-RNS) unterbunden, dessen Sequenz in entgegengesetzter Orientierung zwischen *copB* und *repA* kodiert ist (**5, 114**). Ein rekombinantes Plasmid mit dem *repA* aus der *repB*-Region des *Salmonella*-Virulenzplasmides ist in *E.coli* selbst-replikativ mit einer Stabilität von 76 % (RepA von *S. Enteritidis*) bzw. 95,8 % (RepA von *S. Typhimurium*) (**244, 291**).

Die *repC*-Region weist Nukleotidsequenzhomologien zu dem RepFIB der Plasmide pColV-K30, pO157 und pB171 von *E.coli* auf und hybridisiert mit der IncFI-kodierenden Region des F-Plasmides von *E.coli* (**113, 244, 291**). RepFIB-Replikons besitzen mehrere direkte Nukleotid-Sequenzwiederholungen (sogenannte Iterons), eine Bindungsstelle für das chromosomal kodierte Initiationsprotein DnaA, einen AT-reichen Replikationsstartpunkt, sowie das Gen für das plasmidkodierte Initiationsprotein RepA (38,7 MDa). Bei Ansteigen der Plasmidanzahl in der Bakterienzelle und somit auch vermehrter Bildung von RepA, kommt es zur Bindung von RepA an die Iteron-Sequenzen. RepA kettet so mehrere Plasmide aneinander („Handsellenmodell“) und inhibiert die Replikation (**5**). Auch die *repC*-Region ist selbst-replikativ, wenn sie über einen Plasmidvektor in *E.coli* transformiert wird. Aber die Stabilität des rekombinanten Plasmides beträgt nur 17 % (*repC* von *S. Enteritidis*) bzw. 66,9 % (*repC* von *S. Typhimurium*) (**244, 291**).

Die Sequenz *crs*, eine DNS-Region mit acht direkten inkompletten 17 bp langen Wiederholungen, auf die eine GC-reiche Region aus mehreren indirekten Wiederholungen folgt, zeigt Homologien zu dem primären vegetativen Replikationsstartpunkt *oriV1* des F-Plasmides von *E.coli* (**160**). Die für das *oriV1* bekannte Promotor-Aktivität in bidirektionaler Richtung und die Crossover-Stelle, wurden auch für *crs* nachgewiesen (**152**). Ein Einfluß auf die Regulation der *rep*-Regionen konnte aber nicht gezeigt werden.

#### 2.2.4.1 Plasmidinkompatibilität

Eine Eingruppierung der Virulenzplasmide in eine einheitliche Inkompatibilitätsgruppe ist nicht möglich. So ist das Virulenzplasmid von *S. Dublin* mit IncX-Plasmiden inkompatibel, die Plasmide von *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* sind dagegen IncX-kompatibel (**227**). Das Virulenzplasmid von *S. Typhimurium* koexistierte für mindestens 54 Generationen außerdem auch mit Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen A, B, C, FI, FII, FIV, H1, I(I), I, J, K, L, M, N, O, P, Q, S, T, V, W und Y (**219, 291**). Die Virulenzplasmide können dennoch in zwei Gruppen eingeteilt werden. So erwiesen sich die Plasmide der Serovare Typhimurium, Choleraesuis, Dublin und Enteritidis untereinander als inkompatibel, aber als jeweils kompatibel mit dem Virulenzplasmid von *S. Gallinarum/Pullorum* (**217**). Obwohl das Virulenzplasmid von *S. Typhimurium* mit Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppen FI und FII koexistieren kann, schlugen **TINGE & CURTISS** vor, die *Salmonella*-Virulenzplasmide trotzdem diesen bei-

den Inkompatibilitätsgruppen zuzuordnen, weil die *repB*-Region mit dem IncFII-Replikon von *E.coli* bzw. die *repC*-Region mit dem IncFI-Replikon von *E.coli* hybridisierte (291).

#### 2.2.4.2 Plasmidstabilität

Alle *Salmonella*-Virulenzplasmide zeichnen sich durch eine sehr hohe Stabilität aus und gehen mit einer Verlustrate von weniger als  $10^{-7}$  pro Generation auch über mehrere Laborpassagen der Stämme in der Regel nicht verloren (99, 291). Ursache und molekularer Mechanismus dieser Stabilität sind noch nicht hinreichend aufgeklärt. Fest steht jedoch, daß mehrere plasmidkodierte Produkte und plasmidlokalisierte Regulationssequenzen die gleichmäßige Verteilung von Plasmidkopien auf die beiden Tochterzellen sicherstellen. Relevante Gene bzw. Sequenzen befinden sich in den Genloci *par*, *ccd* und *vag* von *Salmonella*-Virulenzplasmiden.

Die *par*-Region (partition region) wurde 1987 von MICHIELS ET AL. auf dem Virulenzplasmid von *S. Typhimurium* entdeckt (192). Wie Hybridisierungsanalysen nachfolgend zeigten, ist die *par*-Region auch auf den Virulenzplasmiden von *S. Choleraesuis* und *S. Enteritidis* vorhanden, nicht aber auf denen von *S. Dublin* und *S. Pullorum* (39). Ursprünglich galt die *par*-Region als Replikationseinheit. Heute ist klar, daß sie entscheidend zur Stabilisierung des Plasmides beiträgt (48, 192, 206, 291). So führt eine Deletion in der *par*-Region zum raschen Verlust des Virulenzplasmides und zur Attenuierung des betreffenden *Salmonella*-Stammes (204). Transferiert man die *par*-Region in ein pACYC184-Plasmid so wird dieses Plasmid in *E.coli* erheblich zuverlässiger von einer Generation auf die nächste weitergegeben. In diesem Experiment besaßen nach 50 Generationen immer noch mehr als 99 % der *par*-positiven Transformanten das Plasmid, während über 66 % der *par*-negativen *E.coli*-Zellen plasmidlos geworden waren (291). Die *par*-Region besteht aus dem *incR*, den beiden Genen für die *trans*-aktiven Proteine ParA und ParB (44 bzw. 40 MDa), sowie der *cis*-aktiven Sequenz *parS* (48, 291). Diese Elemente bilden zwei jeweils eigenständige Systeme zur Plasmidsegregation. Das eine System besteht, wie bei dem *E.coli*-Plasmid P1, aus ParA, ParB und *parS*, das andere System aus ParA und *incR* (48). Beide Segregationssysteme wirken auf die replizierte Plasmid-DNS ein und stellen sicher, daß Kopien der Moleküle bei der Bakterienzellteilung auf beide Seiten des sich bildenden Septums gelangen (166). Im Gegensatz zu *E.coli*-Plasmiden übt die *par*-Region der *Salmonella*-Virulenzplasmide aber keinen regulatorischen Einfluß auf die Replikationseinheiten *repB* und *repC* aus (48, 206, 291).

Auf den Virulenzplasmiden von *S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis* wurden zwei Leserahmen gefunden, die eine hohe Homologie zu *ccdA* und *ccdB* (coupled cell division) von *E.coli* aufweisen und daher in Analogie zu diesen ebenfalls so benannt wurden (113, 186). CcdA und CcdB sind Strukturkomponenten des Ccd-Addiction-Systemes, das bei der Bakterien-

zellteilung auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wird. CcdB ist die toxische Komponente dieses Komplexes, dessen Toxizität durch die nichtkovalente Bindung von CcdA neutralisiert wird. Jedoch besitzt CcdA eine kürzere Halbwertszeit als CcdB, und muß daher ständig nachgebildet werden um CcdB zu neutralisieren. In plasmidlosen Tochterzellen, die CcdA nicht nachbilden können, entfaltet CcdB seine toxische Wirkung. CcdB hemmt die Gyrase und tötet so die bei der Teilung entstandenen plasmidlosen Segreganden ab (73). Untersuchungen zur Funktionalität des Ccd-homologen Sequenzabschnittes bei Salmonellen wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Der **vag**-Locus ist ausschließlich auf dem Virulenzplasmid von *S. Dublin* vorhanden (44, 234). Die beiden dort vorhandenen Gene, *vagC* und *vagD*, liegen in gleicher Orientierung und überlappen sich um ein Nukleotid. Eine Insertionsmutation in *vagC* führte zur Attenuierung des betreffenden Stammes und zur vermehrten Bildung von verlängerten Bakterienzellen. Dies ließ **PULLINGER & LAX** vermuten, daß die Vag-Proteine die Bakterienzellteilung verzögern, bis eine vollständige Replikation der Plasmide stattgefunden hat (234).

### 2.2.4.3 Konjugation und Mobilisation

Zur Mobilisierbarkeit und Konjugationsfähigkeit der *Salmonella*-Virulenzplasmide liegen bisher nur wenige Untersuchungsergebnisse vor. Vermutlich sind die Plasmide hinsichtlich dieser Eigenschaften unterschiedlich zu bewerten. Frühere Untersuchungen ergaben, daß ausschließlich die Plasmide von *S. Gallinarum*/*Pullorum*-Stämmen durch IncFI- und IncFIV-Plasmide mobilisiert werden konnten, nicht aber die Plasmide von *S. Typhimurium*-, *S. Enteritidis*- oder *S. Dublin*-Stämmen (220). Zudem war keine Konjugationsfähigkeit der Virulenzplasmide der Serovare *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Dublin* und *Gallinarum*/*Pullorum* nachweisbar (141, 220). Im Widerspruch dazu konnten andere Forschergruppen die Virulenzplasmide von manchen *S. Typhimurium*-Stämmen erfolgreich mobilisieren und sowohl auf isogene *Salmonella*- als auch auf *E.coli*-Stämme übertragen (6, 221). Die Virulenzplasmide einiger *S. Typhimurium*-Stämme (LT2, 14028, und SR-11) waren auch konjugationsfähig, während diese Eigenschaft dem Virulenzplasmid eines anderen *S. Typhimurium*-Stammes (SL1344) offensichtlich fehlte (6). Diese Ergebnisse konnten in neueren Nukleotidsequenzanalysen bestätigt werden. So wurde auf dem Virulenzplasmid pSLT des *S. Typhimurium*-Stammes LT2 eine Genregion identifiziert, die der *tra*-/*trb*-Transferregion des F-Plasmides von *E.coli* homolog ist (186). Auf den Virulenzplasmiden pKDSC50 und pFM82139 der Serovare *Choleraesuis* und *Enteritidis* wurden ebenfalls DNS-Sequenzen gefunden, die dieser Region homolog waren. Die Plasmide pKDSC50 und pFM82139 weisen jedoch in diesen homologen DNS-Abschnitten Deletionen auf, so daß die Funktionalität des betreffenden Locus in Frage steht

(siehe auch **Abbildung 2; 113, 244**). Nach Hybridisierungsanalysen sind auf dem Virulenzplasmid von *S. Dublin* keine *tra-/trb*-homologen Sequenzen lokalisiert (**161**).

### 2.2.5 Bedeutung des Virulenzplasmides für die Virulenz von Salmonellen

Die *Salmonella*-Virulenzplasmide besitzen die Fähigkeit, den Grad der krankmachenden Eigenschaften des entsprechenden *Salmonella*-Stammes zu steigern. Das Ausmaß der Virulenzsteigerung ist dabei nicht nur von der betrachteten Wirtsspezies, sondern auch vom jeweiligen Stamm, dessen Serovartugehörigkeit und auch von der Größe des Virulenzplasmides abhängig (siehe **Tabelle 1**).

Bereits in den frühen 80er Jahren belegten erste in vitro-Untersuchungen eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein des 90 kbp Plasmides bei *S. Typhimurium* und der Virulenz der untersuchten Stämme. So waren plasmidlose Stämme in HeLa-Zellkulturen hochsignifikant weniger adhäsiv und weniger invasiv als Stämme mit einem Virulenzplasmid (**141**). Allerdings konnten mehrere Arbeitsgruppen eine solche Korrelation in ihren Zellkulturversuchen nicht nachweisen (**45, 107, 131**). Hinreichend belegt ist dagegen, daß plasmidhaltige *S. Dublin*- und *S. Typhimurium*-Stämme gegenüber Komplement aus Kaninchenserum deutlich stärker resistent sind, als isogene Stämme, aus denen das gesamte Plasmid deletiert worden war (**124**).

In den folgenden Jahren wurden insbesondere Mausinfektionsmodelle benutzt, um die Bedeutung der Plasmide für die Virulenz von Salmonellen genauer zu beleuchten. Dabei zeigte es sich, daß die LD<sub>50</sub> von plasmidlosen *S. Typhimurium*-Stämmen im Vergleich zu ihren jeweiligen plasmidhaltigen Elternstämmen nach oraler, intraperitonealer oder subkutaner Inokulation um das 200- bis über 10<sup>5</sup>fache höher war. Durch die Wiedereinführung eines Virulenzplasmides konnte die ursprüngliche LD<sub>50</sub> rekonstituiert werden (**99, 124, 141, 218, 301**). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit Stämmen der Serovare Abortusequi (**7**), Choleraesuis (**144**), Dublin (**52, 124, 161, 176, 285**) und Enteritidis (**109, 124, 177, 196**) erzielt werden. In einigen Fällen gelang es, die ursprüngliche Virulenz der plasmidlosen Mutanten sogar mit dem Virulenzplasmid aus einem anderen Stamm desselben Serovars wiederherzustellen (**218**). Versuche, eine plasmidkodierte Virulenz bei Stämmen des Serovars Gallinarum/Pulloorum in Mäusen nachzuweisen, gelangen allerdings nicht, da Mäuse selbst bei der Applikation plasmidhaltiger Vertreter dieses Serovars in hoher Dosis nicht erkrankten (**18, 22, 63**).

Die Bedeutung der Virulenzplasmide konnte in den Mausinfektionsmodellen nicht nur an der niedrigeren LD<sub>50</sub>, sondern nach oraler oder s.c.-Infektion auch an der höheren Anzahl von Salmonellen in Leber und Milz abgelesen werden. So fiel die Milz- und Leberbesiedelung um den Faktor 11,7 bis 10<sup>4,5</sup> stärker aus, wenn plasmidhaltige *S. Typhimurium*-Stämme anstelle

von plasmidlosen, isogenen Mutanten zur Infektion verwendet wurden (**99, 104, 127, 221, 301**). Auch ein plasmidhaltiger *S. Enteritidis*-Stamm führte nach oraler Infektion zu  $10^4$ - bis  $10^5$ fachen höheren Keimzahlen in der Milz als die plasmiddeletierte Mutante (**134, 274**). Zu prinzipiell denselben Resultaten kamen andere Untersucher auch mit *S. Choleraesuis*-Stämmen. Nach Infektion von Mäusen mit der plasmidlosen, isogenen Mutante eines *S. Choleraesuis*-Stammes wurden weder Spleno- oder Hepatomegalie noch eine Bakteriämie beobachtet. Diese Symptome waren nach subletaler Infektion der Mäuse mit dem plasmidhaltigen Elternstamm festgestellt worden (**144**). Bei allen Serovaren gelang es, durch die Wiedereinführung der vorher deletierten Plasmide die verminderte Fähigkeit zur extraintestinalen Besiedelung wiederherzustellen. Das Virulenzplasmid von *S. Abortusovis*-Stämmen hatte im Mausinfektionsmodell nur bei der oralen nicht aber bei der intraperitonealen Applikation der Keime einen fördernden Effekt auf die Milzbesiedelung (**296**).

Die Rolle der *Salmonella*-Virulenzplasmide wurde mehrfach auch bei anderen Wirtsspezies untersucht. In Versuchen mit *S. Dublin* bekamen Kälber, die oral mit der plasmidlosen Variante infiziert worden waren zwar Durchfall, überlebten aber den Versuch. Dagegen entwickelten alle Kälber, die parallel dazu mit dem plasmidhaltigen Stamm infiziert worden waren, eine Bakteriämie und verstarben (**306**). Bei einem *S. Gallinarum*- und einem *S. Pullorum*-Stamm sank die Mortalität unter den oral infizierten Hühnerküken durch das Entfernen des Plasmides von 90 % bzw. 70 % auf 0 % und stieg nach der Retransformation des Plasmides wieder auf die ursprünglichen Werte an. Der Effekt des Virulenzplasmides auf die Virulenz dieser beiden Stämme wurde auch bei der i.m.-Applikation von Keimen deutlich. In diesem Modell ergaben die plasmidlosen Varianten der beiden Stämme signifikant höhere  $LD_{50}$ -Werte als die plasmidhaltigen Elternstämme bzw. retransformierten Varianten (**16, 17**). Bei Schweinen führte ein plasmidhaltiger *S. Choleraesuis*-Stamm im Gegensatz zu seinem plasmidlosen Abkömmling nach i.v.-Inokulation zu mehreren Todesfällen (**71**). Für das Erreger-Wirt-System „*S. Enteritidis*-Huhn“ liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In den Untersuchungen von **HINTON ET AL.** besiedelten plasmidhaltige und plasmidlose *S. Enteritidis*-PT4-Isolate den Dickdarm und die Leber von Eintagsküken nach oraler Infektion in gleichem Ausmaß (**126**). **HALAVATKAR & BARROW** beobachteten ebenfalls keine Unterschiede, als sie Hühnerküken oral mit plasmidhaltigen und plasmiddeletierten Varianten eines *S. Enteritidis*-PT4-Stammes infizierten und anschließend die Salmonellenbesiedelung von Milz, Leber, Ovarien und Eiern bestimmten (**109**). Dagegen ließen sich plasmidlose *S. Enteritidis*-Stämme nach oraler Infektion seltener aus der Milz von Eintagsküken reisolieren als plasmidhaltige Stämme (**196**). Möglicherweise muß man die Bedeutung der bei *S. Enteritidis* vorkommenden, unterschiedlich großen Virulenzplasmide für die Virulenz dieses Serovars differenzierter betrachten. Denn in denselben Versuchen von **NAKAMURA ET AL.** waren *S. Enteritidis*-Stämme, die ein 36 MDa-Plasmid besaßen, und ein plasmidloses *S. Enteritidis*-Isolat

gleichermaßen schwach virulent (orale Infektion; 0 oder 1 gestorbenes Tier von jeweils 8 Versuchstieren). Dagegen waren *S. Enteritidis*-Isolate mit einem 58 MDa-Plasmid hochvirulent und führten zum Tod von jeweils allen 8 Probanden (**196**).

Obwohl die Virulenzplasmide mehrere serovarspezifische Eigenschaften besitzen, können sich offenbar einige von ihnen funktional, das heißt in ihren virulenzdeterminierenden Eigenschaften, gegenseitig vertreten. Gemessen an der Mortalität im i.p.-Mausinfektionsmodell ist es möglich, mit einem Virulenzplasmid von *S. Enteritidis* die Virulenz eines *S. Dublin*-Stammes wiederherzustellen, dessen Virulenzplasmid zuvor deletiert worden war (**32**). In ähnlicher Weise erhielt ein *S. Typhimurium*-Stamm mit der Transformation des Virulenzplasmides entweder eines *S. Gallinarum*- oder eines *S. Pullorum*-Stammes seine volle Virulenz wieder zurück (LD<sub>50</sub> im i.v.-Mausinfektionsmodell; **18**). Und auch ein *S. Enteritidis*-Stamm, dem das Virulenzplasmid entfernt worden war, zeigte nach Transformation des Virulenzplasmides von *S. Typhimurium* wieder dieselbe Virulenz wie der ursprüngliche Wildtyp-Stamm (Leberbesiedelung im i.v.-Mausinfektionsmodell; **134**).

Bei einigen *Salmonella*-Serovaren, bei denen ein Virulenzplasmid normalerweise nicht vorkommt, läßt sich die Virulenz durch die Einführung eines Virulenzplasmides künstlich erhöhen. In Versuchen von **ROUDIER ET AL.** überlebten alle Mäuse eine i.p.-Infektion mit plasmidlosen Vertretern der Serovare Heidelberg und Newport. Dagegen starben bis zu 90 % bzw. 80 % der Tiere, wenn diese Stämme zuvor mit dem Virulenzplasmid pSD6 von *S. Dublin* transformiert worden waren. In dem gleichen Experiment stieg die Keimzahl in der Milz auf das 10<sup>3,5</sup>fache an (*S. Heidelberg*). Bei sieben anderen Serovaren, unter anderem den humanpathogenen Serovaren Typhi und Paratyphi A, hatte das Virulenzplasmid allerdings keine Wirkung auf die geprüften Virulenzeigenschaften (**246**).

## 2.2.6 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren und ihre Eigenschaften

### 2.2.6.1 *Salmonella* plasmid virulence (*spv*)-Proteine

Wie bereits im **Abschnitt 2.2.1** erwähnt, ist der sogenannte *spv*-(*Salmonella* plasmid virulence) Genlocus das Kennzeichen eines jeden *Salmonella*-Virulenzplasmides. In der älteren Literatur wurden für die *spv*-Gene auch die Bezeichnungen *vir* (virulence region; **101**), *vsd* (virulence related genes of *S. Dublin*; **154**), *mkf* (mouse killing factor; **206**), *mka* (mouse killing agent; **280**) oder *mba* (mouse bacteremia region; **181**) gebraucht. Seit den frühen 90er Jahren hat man sich jedoch auf die einheitliche Bezeichnung *spv* geeinigt. Die **Tabelle 2** gibt eine Übersicht über die bisherigen Datenbankeinträge von Nukleotidsequenzen aus dem *spv*-Locus. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die ursprünglichen Bezeichnungen der Gene ebenfalls angegeben.

Auch wenn inzwischen mehrere virulenzassoziierte Gene auf den Virulenzplasmiden identifiziert werden konnten, deuten die vorliegenden tierexperimentellen Daten darauf hin, daß dem *spv*-Locus für die plasmidkodierte Virulenz bei Salmonellen die größte Bedeutung zukommt. So war es möglich, die volle Virulenz von *S. Dublin*- und *S. Typhimurium*-Stämmen, die zuvor durch Plasmiddeletion attenuiert worden waren, wiederherzustellen, wenn allein der *spv*-Locus in einen „Low-Copy“-Plasmidvektor kloniert und dieser dann in die Stämme retransformiert wurde (**100, 103, 313**). Für die Serovare Typhimurium, Dublin, Enteritidis und Choleraesuis gilt der kausale Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der *spv*-Gene und der Virulenz von Stämmen im Mausinfektionsmodell zweifelsfrei als belegt (**15, 66, 70, 100, 102, 146, 161, 176, 237, 247, 261, 275, 279, 287, 314**). Salmonellen-Stämme, die die Spv-Proteine bilden können, replizieren sich schneller in befallenen Wirtszellen, führen nach oraler Aufnahme eher zu einer systemischen Besiedelung des Wirtsorganismus und persistieren im Wirt länger als Stämme bzw. Varianten, die Spv-Proteine nicht bilden können (**87, 95, 103-105, 119, 169, 182, 295**). Überhaupt scheinen die Spv-Proteine für die extraintestinale Kolonisation eine wichtige Rolle zu spielen, nicht aber für die intestinale Besiedelung und die Pathogenese der Enteritis. Zwar beobachteten **LIBBY ET AL.** bei *S. Dublin*-Infektionen von Kälbern einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Enteritis und dem Vorhandensein der *spv*-Gene (**169**), in Untersuchungen mit isogenen *S. Typhimurium*- und *S. Dublin*-Knockoutmutanten konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigt werden (**294, 306**). Die Strukturgene *spvB* und *spvC* scheinen für die *spv*-determinierte Virulenz der Salmonellen am wichtigsten zu sein. Denn erstaunlicherweise erzielte ein virulenzplasmiddeletierter Stamm, der mit einem *spvBC*-exprimierenden „High-Copy“-Plasmidvektor transformiert wurde, nach subkutaner Infektion von Mäusen in der Milz die gleichen Keimzahlen wie ein vollvirulenter Wildtyp-Stamm (**183**).

Untersuchungen über die Funktionsweise der Spv-Proteine ergaben bisher nur für SpvR und SpvB einen genaueren Aufschluß über deren Rolle im Infektionsgeschehen (siehe **Seite 24**). Gesichert ist, daß die Spv-Proteine keinen Beitrag zur LPS-Synthese leisten (**145, 304**), nicht an der Synthese von Äußere-Membran-Proteinen beteiligt sind (**306**) und auch nicht mit der Serumresistenz der Salmonellen in Zusammenhang stehen (**273**).

Vor wenigen Jahren wurden *spv*-homologe Nukleotidsequenzen auch im Chromosom verschiedener Subspezies der Spezies *Salmonella enterica* entdeckt (siehe **Seite 27; 1, 39**). Die Funktion und die Bedeutung dieser chromosomal kodierten *spv*-Gene ist noch unbekannt.

**Tabelle 2:** Der plasmidkodierte *spv*-Locus bei *Salmonella enterica* Subspezies *enterica*. Veröffentlichte DNS-Sequenzen sowie die bisher verwendeten Nomenklaturen (Stand Oktober 2002).

Gen	Bezeichnung laut GenBank-Eintrag	Serovar	Stamm, Plasmid	GenBank-Eintrag	Referenz
<b><i>spvR</i></b>	<i>mba1</i>	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	X54148	<b>181</b>
	k. A.	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	E03417	<b>72</b>
	<i>vsdA</i>	Dublin	LANE, pSDL	X56727	<b>154</b>
	<i>spvR</i>	Enteritidis	AL1190, pNL2001	D14491	<b>275</b>
	<i>spvR</i>	Gallinarum	X3796, 85 kbp plasmid	AF030293	<b>223</b>
	33 kDa Prot	Typhimurium	1275, k. A.	X16111	<b>233</b>
	<i>mkfC</i>	Typhimurium	C5, pIP1350	X57092	<b>208</b>
	<i>virR</i>	Typhimurium	SR-11, k. A.	M74110	<b>102</b>
	<i>mkaC</i>	Typhimurium	TML R66, pEX102	X17582	<b>280</b>
	<b><i>spvA</i></b>	<i>mba2</i> (M3)	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	X52035
k. A.		Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	E03417	<b>72</b>
<i>spvA</i>		Choleraesuis	SARB 04, k. A.	AF051819	<b>39</b>
<i>spvA</i>		Derby	SARB 11, k. A.	AF051816	<b>39</b>
<i>vsdB</i>		Dublin	LANE, pSDL	X56727	<b>154</b>
<i>spvA</i>		Dublin	SARB 13, k. A.	AF051817	<b>39</b>
<i>spvA</i>		Enteritidis	AL1190, pNL2001	D14490	<b>275</b>
k. A.		Enteritidis	k. A., k. A.	M73796	<b>159</b>
<i>spvA</i>		Enteritidis	SARB 16, k. A.	AF051818	<b>39</b>
<i>spvA</i>		Gallinarum	SARB 21, k. A.	AF051820	<b>39</b>
<i>spvA</i>		Gallinarum	SARB 51, k. A.	AF051821	<b>39</b>
<i>mkfD</i>		Typhimurium	C5, pIP1350	X57092	<b>208</b>
k. A.		Typhimurium	SR-11, k. A.	Z11557	<b>102</b>
<i>mkaB</i>		Typhimurium	TML R66, pEX102	X17581	<b>280</b>
<b><i>spvB</i></b>		<i>mba3</i> (M2)	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	X51453
	k. A.	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	E03417	<b>72</b>
	<i>vsdC</i>	Dublin	LANE, pSDL	X56727	<b>154</b>
	<i>spvB</i>	Enteritidis	AL1190, pNL2001	D14490	<b>275</b>
	k. A.	Enteritidis	k. A, k. A.	M73796	<b>159</b>
	<i>mkfB</i>	Typhimurium	C5, pIP1350	X57096	<b>209</b>
	k. A.	Typhimurium	SR-11, k. A.	Z11557	<b>102</b>
	<i>mkaA</i>	Typhimurium	TML R66, pEX102	X15042	<b>279</b>

Fortsetzung der **Tabelle 2** auf der nächsten Seite

## Fortsetzung der Tabelle

Gen	Bezeichnung laut GenBank- Eintrag	Serovar	Stamm, Plasmid	GenBank- Eintrag	Referenz
<b>spvC</b>	<i>mba4</i>	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	X51453	<b>179, 181</b>
	k. A.	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	E03417	<b>72</b>
	<i>vsdD</i>	Dublin	LANE, pSDL	X56727	<b>154</b>
	<i>spvC</i>	Enteritidis	AL1190, pNL2001	D14490	<b>275</b>
	k. A.	Enteritidis	k. A., k. A.	M73796	<b>159</b>
	<i>mkfA</i>	Typhimurium	C5, pIP1350	X16098	<b>207</b>
	<i>virA</i>	Typhimurium	SR-11, k. A.	M64295	<b>102</b>
	<i>mkaD</i>	Typhimurium	TML R66, pEX102	M34355	<b>281</b>
<b>spvD</b>	<i>spvD</i>	Abortusequi	L-2508, k. A.	AY038080	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Choleraesuis	RF-1, pKDSC50	AB040415	<b>214</b>
	<i>vsdE</i>	Dublin	LANE, pSDL	X56727	<b>154</b>
	<i>spvD</i>	Dublin	P 100/93, k. A.	AF329248	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Dublin	P 108/93, k. A.	AF329249	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Dublin	x-249/99, k. A.	AF329250	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Dublin	x-7/93, k. A.	AF329251	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Enteritidis	2501/98, k. A.	AF329252	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Enteritidis	2713/97, k. A.	AF329253	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Enteritidis	491/93, k. A.	AF329254	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Gallinarum	Ti 184/64, k. A.	AF329255	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Gallinarum	72/805, k. A.	AF329256	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Gallinarum	1910/93, k. A.	AF329257	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Pullorum	VA 1197/89, k. A.	AF329258	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>virB</i>	Typhimurium	SR-11, k. A.	Z11561	<b>102</b>
	<i>spvD</i>	Typhimurium	5304/98, k. A.	AF329259	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Typhimurium	6785/92, k. A.	AF329260	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Typhimurium	5972/93, k. A.	AF329261	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Typhimurium	x-115/97, k. A.	AF329262	diese Arbeit, <b>26</b>
	<i>spvD</i>	Typhimurium	x-148/98, k. A.	AF329263	diese Arbeit, <b>26</b>

**Erläuterung:** k. A. = keine Angabe

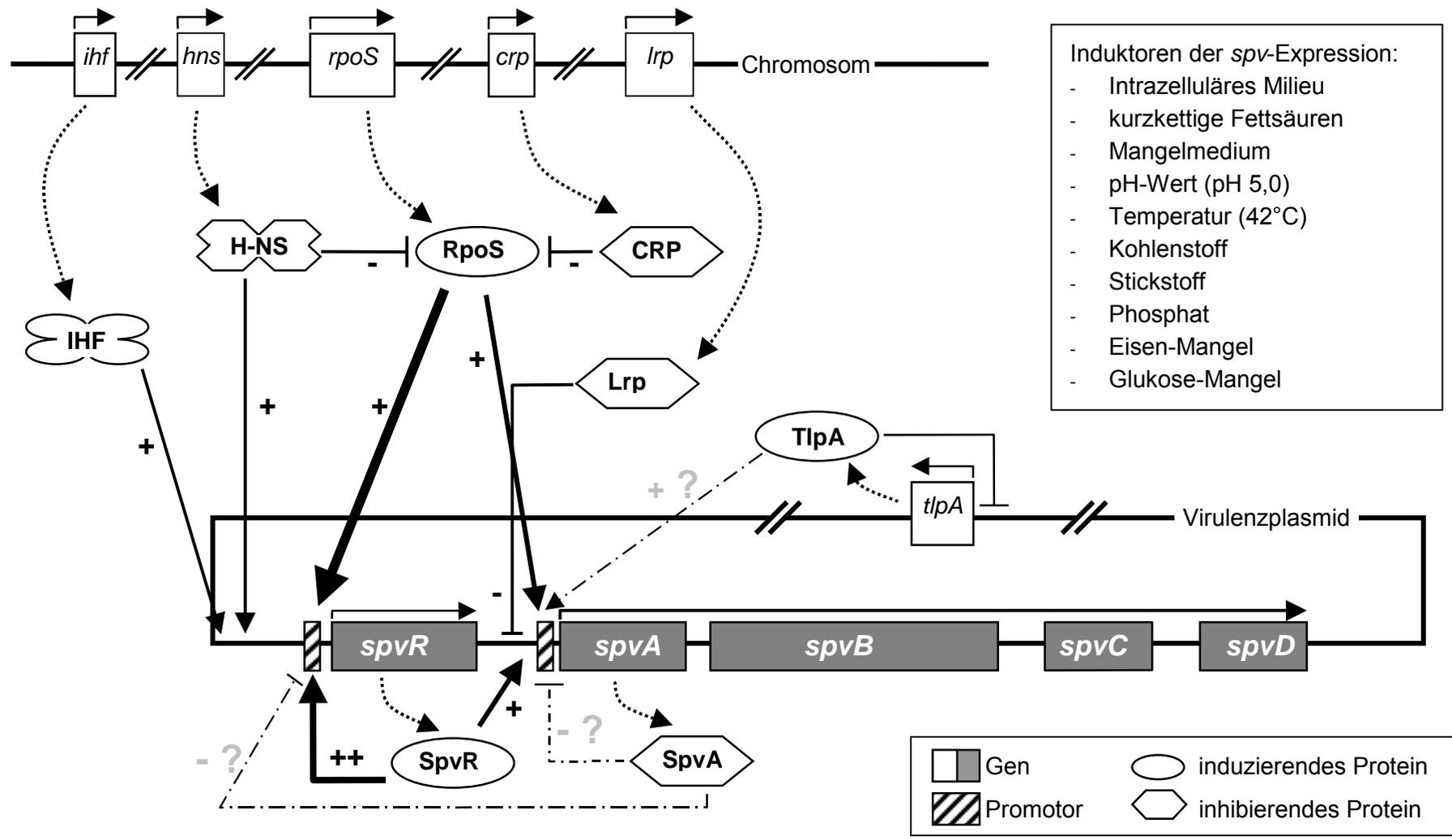
## Struktur und Organisation des *spv*-Locus

Der ca. 7,8 kbp große *spv*-Locus enthält fünf Strukturgene, *spvR*, *-A*, *-B*, *-C* und *-D*, welche in Form eines Operons organisiert sind (**15, 96, 103, 104, 154, 155, 206, 279, 312**). Der gesamte *spv*-Locus ist in Aufbau und Nukleotidsequenz hochgradig konserviert. Dabei betreffen die geringen Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Serovaren nicht nur die *spv*-Strukturgene, sondern auch die intergenischen Abschnitte (0,3 bzw. 0,24 % Differenzen). Die ungleichmäßige Verbreitung des *spv*-Genlocus innerhalb des Genus *Salmonella*, sowie die überdurchschnittlich geringe Sequenzvariabilität dieser DNS-Region nahmen verschiedene Autoren zum Anlaß, die These zu formulieren, dieser Genlocus sei in der Evolution der Salmonellen erst vor vergleichsweise kurzer Zeit durch horizontalen Gentransfer erworben worden. Unterstützt wird diese These durch den Befund, daß der G+C-Gehalt des *spv*-Locus mit nur ca. 46 % geringer ist als der Gehalt von ca. 52 % im restlichen Virulenzplasmid oder im Chromosom von *S. Typhimurium* (**30, 102**).

Alle Gene des *spv*-Locus besitzen die gleiche Orientierung und sind in der Reihenfolge *spvR*, *-A*, *-B*, *-C* und *-D* angeordnet (siehe **Abbildung 3**). Das erste Strukturgen des Operons ist *spvR*, das aus 894 bp besteht. 511 bp hinter dem Stopcodon von *spvR* liegt das Gen *spvA*, welches 768 bp lang ist. Nach *spvA*, von diesem getrennt durch einen 181 bp langen intergenischen Bereich, folgt der Leserahmen *spvB*, der mit 1872 bp der längste des *spv*-Locus ist. Auf *spvB* folgt eine 280 bp lange Sequenz, an die sich das Strukturgen *spvC* (726 bp) anschließt. Einem weiteren, 260 bp umfassenden Abschnitt folgt schließlich *spvD*, das kleinste Strukturgen (651 bp) des *spv*-Locus (**154**).

Promotorstrukturen wurden sowohl vor *spvR* als auch vor *spvA* eindeutig identifiziert (**3, 92, 93, 102, 149, 155, 181**). Der vor *spvR* gelegene Promotor befindet sich 17 bp vor dem Startcodon des *spvR*. Vor dem *spvA*-Startcodon sind zwei Promotoren vorhanden: ein distaler Promotor an der Position zwischen -71 und -51 bp sowie ein proximaler Promotor zwischen -27 und +1 bp (**258**). Rho-abhängige Terminatoren sind sowohl zwischen *spvR* und *spvA* als auch zwischen *spvD* und dem nachfolgenden Leserahmen *orfE* lokalisiert (**102**). Desweiteren liegt ein Rho-unabhängiger Terminator zwischen *spvB* und *spvC* (**151, 153**).

Bei der Transkription der *spv*-Gene wird das Gen *spvR* stets in eine monocistronische mRNA umgeschrieben. Die übrigen *spv*-Gene können in verschiedenen Kombinationen transkribiert werden. Obwohl bis heute keine Terminatoren zwischen *spvA* und *-B* sowie *spvC* und *-D* identifiziert werden konnten, wurde experimentell nachgewiesen, daß ausgehend von einem der vor *spvA* gelegenen Promotoren vier unterschiedlich lange mRNA-Transkripte entstehen: *spvA*-, *spvAB*-, *spvABC*- und *spvABCD*-mRNA (**155**). Eine densitometrische Analyse an Northernblot-Autoradiogrammen ergab, daß diese Transkripte nicht in gleicher Anzahl, sondern



**Abbildung 3:** Schematische Karte des *spv*-Locus und die an der Regulation der Transkription beteiligten Faktoren.

im stöchiometrischen Verhältnis von 30:10:7:1 (*spvA*-, *spvAB*-, *spvABC*- und *spvABCD*-mRNS) gebildet werden. Dieses Verhältnis scheint während der Vermehrung *in vitro* bis in die stationäre Phase stabil zu bleiben (**155**). Vermutlich befinden sich zwischen *spvA* und *-B* sowie *spvC* und *-D* bisher unerkannt gebliebene Terminatoren. Dagegen ist eine posttranskriptionale Modifikation der polycistronischen mRNS unwahrscheinlich, da hierbei auch *spvBCD*-, *spvBC*-, *spvCD*-, *spvB*-, *spvC*- oder *spvD*-mRNS-Transkripte entstehen müßten, die aber bisher niemand beobachtet hat.

### Die Regulation der Expression von *spv*-Genen

Die Expression der *spv*-Gene wird durch exogene Signale stimuliert und auf transkriptioneller Ebene reguliert. Untersuchungen über die Umstände und Signale, die die Expression der *spv*-Gene auslösen bzw. unterdrücken, deuten daraufhin, daß die Bildung von Spv-Proteinen offenbar eine in ihrer Funktion bisher noch unbekannte Antwort von Salmonellen auf einen Mangel an bestimmten Substraten bzw. die Anwesenheit bestimmter Stoffwechselmetaboliten darstellt. Bei der Anzucht in Flüssignährmedien exprimieren Salmonellen ihre *spv*-Gene erst, wenn die Kultur die stationäre Phase erreicht hat, nicht aber solange sie sich in der exponentiellen Vermehrungsphase befinden (**66, 82, 211, 212, 299, 315**). Die Salmonellen lassen sich jedoch auch während der exponentiellen Phase zur Bildung von Spv-Proteinen anregen, wenn man die Salzkonzentration des Nährmediums derjenigen des eukaryontischen Wirtszellzytoplasmas angleicht oder das Medium mit kurzkettigen Fettsäuren in einer Konzentration von 50 mM supplementiert (**77, 315**). Auch ein Mangel an Glucose oder Eisen sowie ein niedriger pH-Wert können die *spv*-Expression induzieren (**82, 266, 299**). Untersuchungen in verschiedenen Zellkultursystemen, die mit *lacZ*-markierten Salmonellen (*spvR*-, *spvA*-, *spvB*-, *spvC*- und *spvD-lacZ*-Fusionen) durchgeführt wurden, legen die Vermutung nahe, daß die *spv*-Gene *in vivo* exprimiert werden, wenn die Salmonellen in Wirtszellen eingedrungen sind bzw. von diesen aufgenommen wurden und intrazellulär liegen. Eine derartige Reaktion scheint unabhängig von Art und Herkunft der Wirtszelle zu sein, da sie sowohl in Zellkulturen aus murinen und bovinen Makrophagen als auch in Kulturen mit Zellen des retikuloendothelialen Systems, humanen Leberzellen oder humanen und caninen Epithelzelllinien beobachtet wurde (**2, 46, 51, 66, 82, 87, 122, 155, 169, 180, 238, 283, 315**).

Entsprechend der stöchiometrischen Verhältnisse zwischen den verschiedenen mRNS-Transkripten des *spv*-Locus (siehe oben), sind die *spv*-Genprodukte bei Anzucht der Salmonellen *in vitro* in der Reihenfolge SpvA, SpvB, SpvC, SpvD nachweisbar (**155, 181**). SpvA und SpvB erreichen ca. 2 h nach Beginn der stationären Wachstumsphase ihre Maximalmenge, SpvC dagegen erst nach ca. 4 h und SpvD sogar erst nach 14 bis 19 h (**78**). Dabei wurden für SpvA und SpvC stammspezifische Unterschiede hinsichtlich der Menge an gebildetem Protein gefunden. So produzierte der *S. Dublin*-Stamm LANE sein SpvA in gut detek-

tierbaren Mengen während der *S. Typhimurium*-Stamm TML R66 das Protein unter denselben Bedingungen nur in schwach nachweisbaren Mengen produzierte. Dieser Unterschied ist wenigstens zum Teil auf die höhere Aktivität des Transkriptionsaktivators SpvR bei dem Stamm LANE zurückzuführen, der in 2 Aminosäuren vom SpvR des Stammes TML R66 abweicht (284). In einer anderen Untersuchung wurden auch stammspezifisch unterschiedlich große Mengen an SpvC bei Stämmen der Serovare *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* und *S. Gallinarum* nachgewiesen (25). Da man heute weiß, daß mindestens 5 Proteine an der transkriptionellen Regulation der *spv*-Gene beteiligt sind, die nicht im *spv*-Locus kodiert sind, müssen Expressionsunterschiede nicht durch Sequenzvariationen im *spv*-Locus selbst begründet sein.

Bis heute wurden für *spv*-Gene die folgenden drei Transkriptionsaktivatoren identifiziert: SpvR (82, 83, 98, 155, 180, 233), RpoS (50, 51, 125, 149, 242) und IHF (178). Dagegen stellen H-NS (212, 242), Lrp (178) sowie SpvA (3, 266) Repressoren der *spv*-Expression dar. Zusätzlich gibt es Hinweise, daß das plasmidkodierte Protein TlpA (62) und auch das Zwei-Komponentensystem PhoP/PhoQ regulierend in die *spv*-Transkription eingreifen (123).

Das Protein **SpvR** aktiviert sowohl die Expression des eigenen Gens (positive Autoregulation) als auch die der übrigen *spv*-Gene (46, 82, 87, 122, 155, 181, 210). Aufgrund seiner Aminosäuresequenz und Größe sowie aufgrund der Struktur seiner funktionalen Domänen gehört SpvR zu den Regulatoren der LysR-Familie (46, 82, 83, 154, 210, 233, 283). Mitglieder dieser Proteinfamilie sind im allgemeinen zwischen 276 und 324 Aminosäuren groß und besitzen eine DNS-Bindungsregion in Form eines Helix-Turn-Helix-Motivs im konservierten Bereich der 65 N-terminalen Aminosäuren und eine Bindungsregion für ein fakultatives Co-Aktivatorprotein, welches die Aktivität des Transkriptionsaktivators verstärkt (181, 252). Bei SpvR wurde ein solcher Co-Aktivator aber noch nicht identifiziert. Die Tatsache, daß *spvR* in der gleichen Richtung abgelesen wird wie die von SpvR regulierten Gene, ist ebenfalls nicht typisch für Regulatoren der LysR-Familie. Nach den Ergebnissen von Bindungsstudien mit rekombinantem SpvR bindet SpvR nicht nur an seinen eigenen Promotor sondern auch hochaffin an die beiden Promotoren vor *spvA* (92, 258). SpvR stimuliert die Transkription von *spvR* auf das 3- bis 10fache und die von *spvA* sogar auf das 100fache (2, 50, 92, 149, 266). Mutationen im Helix-Turn-Helix-Motiv von SpvR verhindern die Bindung an die DNS und die Expression von *spvA* (156). Eine Punktmutation im Promotor von *spvR* verhindert die Bildung der mit dem Helix-Turn-Helix-Motiv von SpvR korrespondierenden DNS-Schleife und damit die *spvABCD*-Expression nahezu vollständig (242).

**RpoS** (37,9 kDa) ist die  $\sigma$ -Untereinheit der bakteriellen RNS-Polymerase. RpoS aktiviert die *spv*-Expression sowohl indirekt durch Bindung an den *spvR*-Promotor als auch direkt durch Bindung an einen der *spvA*-Promotoren (2, 46, 50, 149, 266). Bei *rpoS*-Deletionsmutanten ist

die Expression der *spv*-Gene bis zu 250fach reduziert (**83, 122, 149, 210**). Das ursprüngliche Expressionslevel kann durch Transformation mit einem Plasmidvektor, der ein funktionales *rpoS*-Gen trägt, wieder hergestellt werden (**149**). Da *rpoS*-Deletionsmutanten eine höhere LD<sub>50</sub> besitzen und auch in ihrer Kolonisationsfähigkeit der Peyerschen Platten von BALB/c-Mäusen stärker reduziert sind, als Stämme, denen das gesamte Virulenzplasmid entfernt wurde, reguliert RpoS offensichtlich noch weitere, bisher nicht näher bekannte, chromosomal kodierte Virulenzfaktoren (**83, 200**). Die Bildung von RpoS wird durch Aufnahme der Salmoneellen in Makrophagen oder Epithelzellen bzw. in vitro nach Erreichen der stationären Vermehrungsphase der Kultur (**51, 66, 82, 155, 211, 212, 315**), durch Mangel an Nährstoffen, durch Erhöhung der Temperatur auf 42°C oder Senkung des pH-Werts auf 5,0 induziert (**82, 299**). Der von **O'BYRNE & DORMAN** gefundene inhibierende Einfluß des Faktors **CRP** (cAMP receptor protein) auf die Bildung der Spv-Proteine, wird inzwischen als indirekter Effekt über die Modulation von RpoS angesehen (**211**).

**IHF** (Integration host factor) ist ein Tetramer, das aus zwei  $\alpha$ - (11,4 kDa) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten (10,7 kDa) aufgebaut ist. IHF bindet ca. 160 bp vor dem *spvR*-Promotor an die DNS-Doppelhelix und führt zur Ausbildung einer 180°-Schleife. Durch diese Schleifenbildung wird die Affinität des *spvR*-Promotors für die RNS-Polymerase erhöht und damit die *spv*-Expression insgesamt erhöht (**178, 240**).

Das Protein **H-NS** (Histone-like protein; 15,4 kDa) gehört wie SpvR zur Familie der LysR-Transkriptionsregulatoren und nimmt weitreichend auf Stoffwechselfvorgänge der Bakterien Einfluß (**106**). Bei *S. Typhimurium* inhibiert H-NS die Expression von *rpoS* und wirkt damit negativ regulierend auf die Expression der anderen *spv*-Gene (**23**). Transposoninsertionen in *hns*, die die Funktion des H-NS beeinträchtigen, zogen deshalb eine Steigerung der *spvR*- und *spvB*-Expression auf das zwei- bis dreifache nach sich (**212**). Überraschenderweise exprimierten Mutanten, bei denen sowohl das *hns*-Gen als auch das *rpoS*-Gen deletiert ist, die *spv*-Gene stärker als eine *rpoS*-Deletionsmutante. Dies läßt darauf schließen, daß H-NS auch eine geringgradige direkt oder indirekt stimulierende Wirkung auf die Expression der *spv*-Gene hat (**242**). Die Bildung von H-NS wird durch kurzzeitiges Absenken der Umgebungstemperatur von 37°C auf 10°C in der Lag-Phase der Anzucht induziert (**157**).

Das **Lrp**-Protein (Leucin-responsive regulatory protein; 18,7 kDa) nimmt sowohl positiv als auch negativ auf die Regulation von Genen Einfluß und wird seinerseits durch Leucin reguliert (**47**). Bei niedrigen Leucinkonzentrationen bindet Lrp an den proximalen *spvA*-Promotor, verhindert die Bindung von SpvR und inhibiert dadurch die Transkription der *spv*-Gene (**178**).

Untersuchungen mit rekombinantem **SpvA** haben gezeigt, daß seine Überexpression zu einer verminderten Expression von *spvA* und *spvB* führt. Dieser Befund legt die Hypothese

nahe, daß zumindest *spvA* negativ autoreguliert ist. Der Funktionsmechanismus konnte aber noch nicht aufgeklärt werden, da SpvA keine bekannten DNS- oder RNS-Bindungsmotive besitzt (**2, 266, 316**).

Auf dem Virulenzplasmid befindet sich auch der Leserahmen für den Faktor **TlpA**. Aufgrund strukturanalytischer Untersuchungen wird vermutet, daß TlpA an einen oder beide *spvA*-Promotoren bindet und so die Expression beeinflusst. Experimentell wurde diese Funktion jedoch noch nicht belegt (**62**). Bei TlpA (41,5 kDa) handelt es sich um ein sogenanntes „Coiled-Coil“-Protein, das in der Bakterienzelle in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zu Filamenten polymerisieren kann. TlpA aktiviert die Expression des eigenen Gens bei Steigerung der Temperatur von 17°C auf 37°C (**62, 137, 138, 148**).

Neuere Daten lassen vermuten, daß die Regulation der *spv*-Gene auch mit dem zwei-Komponenten-System **PhoP/PhoQ** in Verbindung steht. Das PhoP/PhoQ-System ist an der Regulation von ca. 40 verschiedenen Virulenzloci bei Salmonellen beteiligt und moduliert das Transkriptionsmuster der Salmonellen während der intrazellulären Phase der Infektion (**106, 193**). Während frühere Daten einen Zusammenhang zwischen *spv*-Transkription und PhoP/PhoQ ausschlossen (**82**), wurde in neueren Untersuchungen die PhoP/PhoQ-abhängige Expression der *spv*-Gene belegt (**123**). So scheint es, daß die *spv*-Expression während der stationären Vermehrungsphase der Salmonellen-Kultur von PhoP/PhoQ unabhängig ist, aber über das PhoP/PhoQ-System aktiviert wird, wenn die Anzucht der Bakterien in einem Nährmedium erfolgt, das dem intrazellulären Milieu der Wirtszelle entspricht (**264**).

### **Die Spv-Proteine**

Die fünf vom *spv*-Locus kodierten Proteine unterscheiden sich in Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt deutlich voneinander, werden von der Bakterienzelle in unterschiedliche Kompartimente transportiert und haben vermutlich auch unterschiedliche Wirkungsmechanismen (siehe **Tabelle 3**). Ein gemeinsames Merkmal ist, daß sie offensichtlich nicht über den „general secretory pathway“ der Proteinsekretion von der Zelle abgegeben werden. So gibt es in ihren Strukturgenen keinen Hinweis auf ein bekanntes Signalpeptid-Motiv und auch aminoterminalen Sequenzanalysen der gebildeten Proteine deuten nicht auf eine posttranslationale Modifikationen der Peptidkette hin (**282**). Ferner stimmten die experimentell ermittelten molekularen Massen nach nativer oder rekombinanter Expression der *spv*-Gene stets mit den vorhergesagten molekularen Massen überein (**102, 206, 247, 298, 299**).

**Tabelle 3:** Eigenschaften und Funktionen der Spv-Proteine.

Protein	AA	MG [kDa]	IP	Lokalisation in der Bakterienzelle <sup>1)</sup>	Wirkmechanismus	Determinante der Virulenz <sup>2)</sup>
<b>SpvR</b>	297	33,9	9,28	nicht getestet	Transkriptioneller Regulator der LysR-Familie; Aktivator der <i>spv</i> -Gen-Expression	+
<b>SpvA</b>	255	28,2	4,69	Äußere Membran	unbekannt	-
<b>SpvB</b>	593	65,6	5,26	Zytoplasma und Zytoplasma-Membran  Äußere Membran nach Überexpression	Aktin-ribosylierende Mono(ADP-ribosyl)- transferase	+
<b>SpvC</b>	241	27,6	7,07	Zytoplasma  Äußere Membran nach Überexpression	unbekannt	+
<b>SpvD</b>	216	24,8	6,75	Zytoplasma, Zytoplasma- Membran, Äußere Membran und extrazellulär im Kulturüberstand	unbekannt	+

**Erläuterung:** **AA** = Anzahl Aminosäuren; **MG** = Molekulargewicht;  
**IP** = isoelektrischer Punkt.

**1)** Angaben zur Lokalisation in der Bakterienzelle nach **EL-GEDAILY ET AL.** (1997) und **VALONE & CHIKAMI** (1991).

**2)** +/- = Attenuierung eines *Salmonella*-Stammes durch Deletion des entsprechenden Genes möglich/nicht möglich.

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, ist das Protein **SpvR** (33,9 kDa) der Hauptregulator der *spv*-Transkription und für die *spv*-kodierte Virulenz essentiell. Im Mausinfektionsmodell konnten Stämme des Wildtyps von *S. Typhimurium* nach oraler Applikation in der Milz in einer bis zu 13.500fach höheren Keimzahl nachgewiesen werden als die entsprechenden *spvR*-Transposonmutanten. Mäuse, die mit der Mutante infiziert wurden, überlebten die Infektion, während die mit dem Wildtyp-Stamm infizierten Tiere alle verstarben. Es ist des weiteren möglich, die reduzierte Virulenz einer *spvR*-Deletionsmutante durch Komplementierung mit dem *spvR*-Gen in *trans* (Plasmidvektor) wieder auf das ursprüngliche Niveau anzuheben (**32, 170, 233, 237, 247, 280, 295**). Die bedeutende Rolle von SpvR wurde für *S. Dublin* auch im Infektionsmodell an Kälbern gesichert. Während die mit der *spvR*-Deletionsmutante infizierten Tiere ausschließlich eine leichte Diarrhoe entwickelten, litten die mit dem Wildtyp- oder dem *spvR*-komplementierten-Stamm infizierten Kälber unter einer hochgradigen, wässrigen Diarrhoe sowie Bakteriämie (**169**).

Das Protein **SpvA** hat eine Molekulargewicht von 28,2 kDa und kommt vorwiegend in der äußeren Membran der Salmonellen vor (**78, 299**). SpvA ist das einzige Spv-Protein, bei dem

ein kausaler Zusammenhang mit der Virulenz von Salmonellen mit Hilfe gentechnischer Methoden nicht nachgewiesen werden konnte. So waren *spvA*-Mutanten (Deletions-, Terminations- oder Transposonmutanten) bei oraler oder i.p.-Infektion von Mäusen genauso virulent wie Wildtyp-Stämme (46, 247, 316). Im Widerspruch dazu steht der Befund einer anderen Studie, in der eine *spvA9::Tn5*-Mutante in ihrer Virulenz gemindert war. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Insertion des Transposons Tn5 einen polaren Effekt auf das folgende Gen *spvB* hatte und dadurch attenuierend wirkte (102). Die einzige Sequenzhomologie, die für SpvA bisher gefunden wurde, liegt im N-terminalen Bereich des Proteins. So weist SpvA zu dem Protein TccA des insektenpathogenen Bakteriums *Photorhabdus luminescens* eine 26 %-ige Übereinstimmung in der Primärstruktur auf. TccA ist Bestandteil des komplexen Toxinmoleküls Tcc, das eine insektizide Wirkung besitzt (36, 307).

**SpvB** ist mit einem Molekulargewicht von 65,6 kDa das größte der Spv-Proteine. SpvB ist nach Anzucht der Salmonellen *in vitro* vor allem im Zytoplasma und der Zytoplasma-Membran der Bakterienzelle lokalisiert, nach experimenteller Überexpression in *E.coli* auch in der äußeren Membran (78, 298, 299). SpvB ist für die plasmidvermittelte Virulenz der Salmonellen wichtig, da *spvB*-Deletions- und Transposonmutanten im Mausinfektionsmodell deutlich attenuiert waren. So führte die orale Infektion von Mäusen mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp zu einer 426fach stärkeren Milzbesiedelung, sowie einer 17fach höheren Keimzahl in den Peyerschen Platten als die Infektion mit einer *spvB*-Tn-Mutante (15, 70, 102, 237, 247, 294, 314). Überraschenderweise konnte ein in *trans* zugeführtes *spvB*-Gen (Plasmidvektor) aber weder die Virulenz einer polaren *spvB*-Transposonmutante noch die Virulenz einer nicht-polaren *spvB*-Deletionsmutante wieder herstellen (102, 183). Die Fähigkeit, die Milz in derselben Intensität zu besiedeln wie der vollvirulente Wildtyp-Stamm war erst nach Transformation von einem Plasmid möglich, das das *spvB*-Gen in seiner natürlichen Verbindung mit dem *spvC*-Gen trug. Als Erklärung für dieses unerwartete Phänomen bieten die Beobachter an, daß das *spvC*-Gen die Stabilität der *spvB*-mRNS und damit die Expression des *spvB*-Gens positiv beeinflusst (183). Aufgrund C-terminal gelegener Motive in seiner Aminosäuresequenz sowie experimentell nachgewiesener Enzymaktivitäten zählt man SpvB zu den Mono(ADP-ribosyl)transferasen (216). Mono(ADP-ribosyl)transferasen sind Enzyme, welche Proteinfunktionen durch Bindung von ADP-Ribose regulieren. Von vielen bakteriellen Toxinen ist bekannt, daß sie über die ADP-Ribosylierung in den Zellstoffwechsel eingreifen, wie zum Beispiel das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, das VIP-2 von *Bacillus cereus* oder das Iota-, das C2- oder das C3-Toxin von *Clostridium* spp. (8, 111, 139, 224). SpvB besitzt ein Bi-Glutamat-Motiv in seinem fünften  $\beta$ -Faltblatt und weist damit das typische Merkmal der Arginin-ribosylierenden Transferasen auf. Da SpvB in der Zellkultur die Ribosylierung von Aktin katalysierte, gehört es zur sogenannten Klasse IV der Mono(ADP-ribosyl)transferasen (165, 288). Infolge der Aktin-Ribosylierung kann monomeres Aktin nicht mehr

zu filamentärem Aktin verarbeitet werden und es kommt zum Umbau im Zytoskelett der Wirtszelle. Noch ist ungeklärt, auf welchem Weg SpvB zu den Aktinmolekülen im Zytosol der Wirtszelle gelangt, da Salmonellen in der Wirtszelle in einem membranumschlossenen Vesikel (Phagolysosom) verbleiben und es außerdem keinen Anhaltspunkt dafür gibt, daß SpvB von den Salmonellen sezerniert wird. Mit SpvB ist erstmals eine Mono(ADP-ribosyl)transferase bei einem fakultativ intrazellulär lebenden Bakterium gefunden worden. Im N-terminalen Anteil besitzt SpvB Sequenzhomologien zu den Proteinen TcaC und TcdB von *Photobacterium luminescens* (siehe auch SpvA; **36, 307**). TcaC und TcdB sind jeweils Bestandteil der beiden sezernierten, komplexen Toxine Tca und Tcd, die, wie auch das oben erwähnte Tcc, insektizide Wirkung besitzen (**34**). SpvB ist in seiner N-terminalen Aminosäuresequenz auch dem Faktor CatM von *Acinetobacter calcoaceticus* ähnlich, bei dem es sich um einen positiven Transkriptionsregulator der LysR-Familie handelt (**2**). Im mittleren Abschnitt der Polypeptidkette von SpvB sind Ähnlichkeiten zu dem Ace-Toxin von *Vibrio cholerae* vorhanden, welches vermutlich als Ionen-Transporter-ATPase agiert (**293**).

Das Protein **SpvC** (27,6 kDa) kommt im Zytoplasma der Salmonellen (**78**), bei experimenteller Überexpression in *E.coli* oder Salmonellen auch in der äußeren Membran der Bakterienzelle vor (**298, 299**). Im Mausinfektionsmodell konnten die virulenzdeterminierenden Eigenschaften von SpvC aufgezeigt werden. So verhinderte eine Tn5-Insertion zwischen *spvB* und *spvC* die Expression von *spvC* und führte bei oraler Infektion zu einer im Vergleich zu dem *S. Typhimurium*-Wildtyp-Stamm ca. 2.500fach geringeren Keimzahl in der Milz. Durch Expression von *spvC* in *trans* (Plasmidvektor) wurde die Kolonisationsfähigkeit der Transposonmutante wieder hergestellt (**66, 100, 101, 247**).

Bei **SpvD** handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 24,8 kDa. SpvD wurde nach Anzucht von Salmonellen *in vitro* sowohl im Zytoplasma der Bakterienzelle als auch im Kulturüberstand entdeckt. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus der Proteinsekretion ist ungeklärt (**78**). Das Protein SpvD ist kausal an der Virulenz der betreffenden *Salmonella*-Stämme beteiligt. So kann man *spvD*-positive Stämme signifikant attenuieren, wenn man das Leseraster des *spvD*-Strukturgens durch die Insertion von Terminatoren oder Transposons zerstört (**32, 100, 154, 206, 247**). Ein *spvD*-deletierter *S. Typhimurium*-Stamm erreichte in der Milz oral infizierter BALB/c-Mäuse nur noch 1,1 % der Keimzahl des vollvirulenten, isogenen Wildtyp-Stammes. Die volle Besiedlungsfähigkeit ließ sich durch Re-Transformation von *spvD* in einem Expressionsplasmidvektor wieder herstellen (**102, 183**).

Das 609 bp stromabwärts von *spvD* gelegene **orfE**-Gen wurde anfänglich als Bestandteil des *spv*-Locus angesehen. Heute wird es jedoch nicht mehr dazu gezählt. Die Zerstörung des Gens durch Transposoninsertion zog jedenfalls keine Minderung der Virulenz des betreffenden Stammes nach sich (**32, 102**). Die Regulation der *orfE*-Expression scheint nicht in die

Regulation des *spv*-Locus eingebunden zu sein. So wurden zwischen *spvD* und *orfE* sowohl Terminator- als auch Promotorstrukturen identifiziert. Außerdem ist keine Abhängigkeit der Genexpression von der Wachstumsphase der Kultur bei *orfE* zu beobachten, sondern die Bildung von OrfE (13,5 kDa) erfolgt konstitutiv (**82, 102, 154**).

### Der chromosomale *spv*-Locus

Zwei verschiedene Arbeitsgruppen, **BOYD & HARTL** und **AABO ET AL.**, entdeckten *spv*-homologe Sequenzen mittels DNS-DNS-Hybridisierung und/oder PCR mit anschließender Sequenzierung auch im Chromosom von mehreren plasmidlosen Stämmen der Subspezies *diarizonae* (IIIa), *houtenae* (IV), *indica* (VI) und VII von *Salmonella enterica*. **BOYD & HARTL** verwendeten hierbei mehrere verschiedene Gensonden, die entweder einzelne *spv*-Gene oder den gesamten *spv*-Locus abdeckten (**40**). Mit *spvA*- und *spvC*-spezifischen PCRs erzeugten sie außerdem diskrete Amplifikate, die im Falle von *spvA* auch sequenziert und in ihrer Identität bestätigt wurden (GenBank-Einträge AF0518116 bis AF051829; **39**). Interessanterweise fanden sie bei allen Stämmen der Subspezies IIIa eine 99 bp große Insertion im *spvA*-Gen. Bei allen Stämmen der Subspezies IV und VII war ein 255 bp großes intragenisches Fragment durch ein 60 bp-Fragment unbekannter Herkunft ersetzt. Dagegen war das mittels *spvC*-spezifischer PCR erzeugte Amplifikat genauso groß wie das Amplifikat aus dem plasmidkodierten *spvC*-Gen. Ähnliche Resultate erzielten auch **AABO ET AL.**, die die chromosomal kodierten *spv*-Gene mittels PCR bei einem Stamm der Subspezies IV Serovar 16:z<sub>4</sub>,z<sub>32</sub>:- fanden und das überraschend kleine *spvA*-homologe Amplifikat nachfolgend sequenzierten (GenBank-Eintrag AF162686; **1**). Untersuchungsergebnisse zur Expression von chromosomal kodierten *spv*-Genen oder zur Bedeutung dieser Sequenzen für die Virulenz von Salmonellen wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

#### 2.2.6.2 „Plasmid encoded fimbriae“ (Pef)

Im Jahre 1990 wurde entdeckt, daß das *Salmonella*-Virulenzplasmid auch für bestimmte Fimbrien kodiert, die deshalb nachfolgend als Pef-Fimbrien (plasmid encoded fimbriae) bezeichnet wurden (**90, 241**). Die Pef-kodierenden Gene *pefA*, *-B*, *-C*, *-D*, und *-I* bilden einen ca. 7 kbp großen Genlocus, an dem sie alle in gleicher Orientierung angeordnet sind. Zwischen *pefD* und *pefI* liegen zwei weitere Leserahmen mit den Bezeichnungen *orf5* und *orf6* (**90**). Die primären Translationsprodukte der Gene *pefA*, *-C* und *-D* besitzen eine 19 bis 24 Aminosäuren umfassende Signalsequenz und werden über den „general secretory pathway“ von der Bakterienzelle sezerniert (**90**). Pef-Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz manchen Proteinen der Pap-Fimbrie von uropathogenen *E.coli* und der F4-Fimbrien enterotoxischer *E.coli* sehr ähnlich (**241**). PefB (11,6 kDa) und PefI (4 kDa) besitzen Merkmale von transkriptionellen Regulatoren. PefA (15,2 kDa) ähnelt den Nebenstrukturproteinen der

*E.coli*-Fimbrien F4 und Pap. PefC (83,7 kDa) ist zum Fimbrial-Assembly-Protein PapC strukturhomolog und PefD (23,1 kDa) zum periplasmatischen Chaperon PapI. Die mutmaßlichen Produkte der beiden Leserahmen *orf5* und *orf6* (16,4 und 28,3 kDa) weisen keine Homologien zu bekannten Proteinen auf. Ihre Funktion bei der Synthese von Pef-Fimbrien ist daher ungeklärt. Allerdings unterbindet die Transposonmutagenese in diesen beiden Genen die Expression von Pef-Fimbrien (**28, 90, 241**).

Pef-Fimbrien wurden bisher nur bei *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Stämmen nachgewiesen, und nur bei solchen Stämmen, die das Virulenzplasmid besitzen. Nach Transformation der entsprechenden Genabschnitte in fimbrienfreie *E.coli* können die Pef-Fimbrien mittels Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie auch bei den Transformanten dargestellt werden (**31, 90, 241, 243, 318**). DNS-Sequenzen mit Homologie zu verschiedenen *pef*-Genen kommen zwar auch bei Stämmen der Serovare Choleraesuis, Bovismorbificans, Paratyphi C und Typhisuis vor. Versuche, die Pef-Fimbrien bei diesen Stämmen mit Hilfe phänotypischer Methoden nachzuweisen, verliefen allerdings nicht erfolgreich (**29, 113, 172, 318**).

Die Expression der *pef*-Gene wird auf Ebene der Transkription in Form einer Phasenvariation reguliert. Dabei wechselt der Promotor von *pefB* zwischen einem aktivierten und inaktivierten Zustand hin und her („Flip-Flop“-Mechanismus). Die Aktivierung basiert wie bei der Regulation des *pap*-Operons von *E.coli* auf der Methylierung der GATC-II-Stelle in der Promotor-Region von *pefB* (**136**). Als Aktivatoren wurden die Regulatorproteine Lrp und Dam identifiziert, als Repressoren RpoS, H-NS und PefI. Ein Auslöser für *pef*-Expression ist das Absenken des pH-Wertes im Anzuchtmedium auf 5,1. Inhibierend wirken das Absenken der Temperatur auf 21°C, ein Eisenionen-Mangel oder die Zugabe von 0,5 M NaCl bei der Anzucht. Die Expression der Pef-Fimbrien ist von der Zelldichte der Kultur unabhängig und somit wahrscheinlich nicht im Rahmen des Quorum Sensing der Bakterienzelle reguliert (**199**). Die Regulation der *pef*-Expression bei *S. enterica* ist die erste methylierungsabhängige Genregulation, die in einer anderen Bakterienspezies als *E.coli* gefunden wurde.

Beobachtungen im Mausinfektionsmodell legen die Vermutung nahe, daß die Pef-Fimbrien als Kolonisationsfaktoren wirken und *S. Typhimurium*-Keimen die Adhäsion an die Dünndarmepithelzellen ermöglichen. Allerdings scheint *S. Typhimurium* über mehrere, sich ergänzende Kolonisationsfaktoren zu verfügen, so daß ein Verlust der Pef-Fimbrien (zum Beispiel infolge der Deletion von Strukturgenen) die LD<sub>50</sub> des entsprechenden Stammes nur 2,4fach erhöhte. Erst durch die gleichzeitige Inaktivierung von 4 Fimbrien-Loci (*lpf*- [long polar fimbriae], *fim*- [type 1 fimbriae], *agf*- [aggregative fimbriae] und *pef*-Locus) wurde die LD<sub>50</sub> des mutierten *S. Typhimurium*-Stammes auf das 25fache erhöht. Die Vierfachmutanten konnten zudem im Gegensatz zu den Einzelmutanten nicht mehr aus dem Kot der Mäuse reisoliert werden (**300**). Anhand *pef*-spezifischer Antikörper in Serumproben von Hühnern

konnte belegt werden, daß auch *S. Enteritidis*-Stämme die Pef-Fimbrien in vivo bilden und diese sogar ein Ziel für die spezifische Immunreaktion des infizierten Wirtsorganismus abgeben (318).

### 2.2.6.3 „Fae-like“-Fimbrien

Auf dem Virulenzplasmid von *S. Gallinarum/Pullorum* wurden zwei Gene identifiziert, deren mutmaßliche Produkte (28 und 27 kDa) eine hochgradige Sequenzhomologie zu den Strukturproteinen FaeH und FaeI der F4-Fimbrien von *E.coli* aufweisen. Sie wurden daher *faeH*- und *faeI*-like-Gene genannt. Da der G+C-Gehalt der DNS in diesem Bereich mit 38,4 % deutlich niedriger ist als der des restlichen Virulenzplasmides (52 %), könnten diese beiden Gene durch horizontalen Transfer erworben worden sein. Mittels DNS-DNS-Hybridisierung konnten die *fae*-like-Gene auch auf dem Virulenzplasmid von *S. Dublin*, nicht aber bei Typhimurium, Choleraesuis oder Enteritidis nachgewiesen werden (248).

### 2.2.6.4 Typ-1-homologe Fimbrien

Mittels Transposonmutagenese und Sequenzierung wurde auf dem Virulenzplasmid von *S. Typhimurium*, ein Genlocus entdeckt, der dem *fim*-Locus von *E.coli* sequenzhomolog ist und daher *fim-like*-Locus benannt wurde (GenBank-Eintrag AF053353, 42). Der *fim*-Locus von *E.coli*-Bakterien kodiert für deren sogenannte Typ-1-Fimbrien. Es bestehen allerdings Zweifel, daß sich der bei *S. Typhimurium* entdeckte Genlocus tatsächlich auf dem Virulenzplasmid befindet. Denn bei der Kompletsequenzierung des Virulenzplasmides von *S. Typhimurium* Stamm LT2 tauchte dieser Genlocus nicht auf. Dagegen wurde sowohl im Chromosom dieses Stammes als auch im Chromosom von *S. Typhi* Stamm CT18 das *bcf*-Operon (*b*ovine *c*olonisation *f*actor-Operon) entdeckt, das dem *fim-like*-Locus in seiner Nukleotidsequenz zu über 98 % homolog ist (186, 222, 295). Es ist vorstellbar, daß bei den Untersuchungen von **BROCCHI ET AL.** das *bcf*-Operon im Zuge der Transposonmutagenese aus dem Chromosom auf das Virulenzplasmid transferiert worden ist und auch bei dem von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Stamm dort nicht bereits originär vorgelegen hat (42). Offensichtlich kodiert das *bcf*-Operon für einen weiteren Faktor zur Anheftung von *S. Typhimurium* an Darmepithelzellen. Jedenfalls verminderte eine Tn5-Insertion in *bcfC* signifikant die Besiedelung der Peyerschen Platten durch einen virulenten *S. Typhimurium*-Stamm bei Kälbern, die oral mit dieser Mutante infiziert wurden. Das mutmaßliche BcfC-Protein ist in seiner Aminosäuresequenz dem Fimbrial-Assembly-Protein FimD der *E.coli*-Typ-1-Fimbrien zu 49 % ähnlich (295).

### 2.2.6.5 Faktoren der Komplementresistenz

Erste Hinweise auf Zusammenhänge zwischen dem Virulenzplasmid und der Serumresistenz von Salmonellen finden sich bereits im Jahr 1985. Stämme von *S. Typhimurium*, *Enteritidis*, *Dublin* und *Choleraesuis*, die ein Virulenzplasmid besaßen, waren gegenüber der bakteriolytischen Wirkung von 90 %-igem Meerschweinchen-Serum deutlich resistenter als Stämme ohne Virulenzplasmid (124). Inzwischen wurden insgesamt drei Loci (*rsk*, *rck* und *traT*) identifiziert, die unabhängig voneinander für den serumresistenten Phänotyp kodieren (61, 108, 270, 286, 287, 304).

Bei *rsk* (reduced serum killing) handelt es sich nicht um ein Strukturgen, sondern um eine Nukleotidsequenz, in der ein 10 bp langes Sequenzmotiv im Abstand von jeweils 11 bp insgesamt viermal wiederholt wird. Die beiden mittleren Motive stimmen exakt miteinander überein („TACAGCTTAT“), die erste und letzte Wiederholung sind degeneriert und entsprechen jeweils nur in 8 Positionen dieser Consensussequenz. Für die Serumresistenz ist das Vorhandensein von wenigstens der drei distalen Kopien des konservierten Sequenzmotivs essentiell. Promotorstrukturen oder ein Start- und Stopcodon sind nicht nachweisbar. Da auch kein Peptidprodukt dieses Genabschnittes identifiziert werden konnte, wird vermutet, daß es sich bei *rsk* um eine Bindungsstelle für ein bisher unbekanntes Regulatorprotein handelt (303, 304).

Das **Rck**-Protein (resistance to complement killing) ist ein 17 kDa schweres Äußere-Membran-Protein, das für die Resistenz von *S. Typhimurium* gegen die bakterizide Wirkung von Serum und die Invasion in Säuger-Zellkulturlinien mitverantwortlich ist (61). Das 19 kDa Vorläuferprotein wird nach Proteolyse der Signalsequenz in die äußere Membran eingebaut und verhindert die bakterizide Wirkung des Komplementsystems durch Störung der Polymerisation von C5b-9 (120). Rck besteht aus acht, die äußere Membran der bakteriellen Zellwand durchziehende Domänen, wodurch vier äußere und drei innere Schleifen gebildet werden. Durch die Substitution einer einzelnen Aminosäure in der dritten nach außen gerichteten Schleife von Rck konnte die Resistenz des betreffenden *Salmonella*-Stammes gegenüber humanem Serum deutlich vermindert werden (61). Rck ist strukturhomolog zu anderen virulenzassoziierten Proteinen, wie PagC von *S. Typhimurium* (für Überleben in Makrophagen und Mausvirulenz der Salmonellen) und Ail von *Yersinia enterocolitica* (für Adhäsion und Invasion der Bakterien in epitheliale Zellen). Strukturähnlichkeiten sind auch zu OmpX von *Enterobacter cloacae*, zu Lom des lysogenen Bakteriophagen Lambda, sowie zu OmpX von *E. coli* vorhanden, deren Funktionen noch ungeklärt sind (120, 189). Die Proteine weisen untereinander große Ähnlichkeiten in den die äußere Membran durchziehenden Abschnitten auf, wogegen sie vor allem in den nach außen gerichteten Schleifen verschieden sind.

Bei **TraT** handelt es sich um ein sezerniertes Protein, das nach Abspaltung einer 20 Aminosäuren langen Signalsequenz, ein Molekulargewicht von 24 kDa hat. TraT besitzt eine N-terminale Lipid-Bindungsstelle sowie zwei nah beieinander liegende hydrophobe Regionen (272). Das *traT*-Gen wurde bisher nur bei virulenzplasmidhaltigen Stämmen gefunden, und auch nur bei *S. Typhimurium*, nicht aber bei *S. Dublin* und *S. Enteritidis* (244, 273). Der Funktionsmechanismus von TraT ist noch nicht bekannt. Untersuchungen haben gezeigt, daß TraT das Eindringen von Gentianaviolett und hydrophoben Antibiotika durch die äußere Membran von Salmonellen und *E.coli* verhindert. Punktmutationen im *traT*-Gen, die in den Bereichen liegen, die für die hydrophoben Regionen von TraT kodieren, erhöhten die Permeabilität der äußeren Membran und führten auch zu einer verminderten Resistenz gegenüber Meerschweinchen-Serum. Nach Transformation des Keimes mit einem intakten *traT*-Gen in *trans* war die Permeabilität wieder so niedrig wie im Wildtyp-Stamm (236, 270-273). Auf die Vermehrung von *S. Typhimurium* in Leber-Makrophagen hat TraT keinen Einfluß (236).

#### 2.2.6.6 Mig-5

**VALDIVIA & FALKOW** gelang der Nachweis eines weiteren, virulenzassoziierten Gens auf dem Virulenzplasmid von *S. Typhimurium*. Durch gentechnische Fusion mit dem Gen für das „green fluorescent protein“ (*gfp*) konnten sie 14 Promotoren identifizieren, die bei intrazellulär in Makrophagen-ähnlichen RAW 264.7-Zellen gelegenen Salmonellen aktiv sind, aber nicht bei zellfrei angezüchteten Salmonellen. Einer dieser Promotoren war auf dem Virulenzplasmid ca. 2 kbp vor dem *spv*-Locus gelegen. Das zugehörige Gen, das als *mig-5*-Gen (macrophage inducible gene) bezeichnet wurde, wurde bei intrazellulärer Lage der Salmonellen ca. 24fach stärker exprimiert als bei extrazellulärer Lokalisation der Bakterienzelle. Bei dem Genprodukt handelt sich um ein Lipoprotein, das unter der Regulation des PhoP/PhoQ-Regulator-Komplexes steht und als Carboanhydrase wirkt. *S. Typhimurium*-Mutanten, bei denen das *mig-5*-Gen durch Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens inaktiviert worden war, erreichte in der Milz von Mäusen nach i.p.-Inokulation nur 15 % der Keimzahlen, die für den Wildtyp-Stamm ermittelt wurden. Der Angriffsort der Carboanhydrase konnte bisher nicht geklärt werden (297).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang aufgelistet.

##### 3.1.2 Bakterienstämme

In der **Tabelle 4** sind die verwendeten *Salmonella*-Referenzstämme und relevante Feldisolate aufgeführt. Neben diesen Stämmen wurden 874 Salmonellen-Isolate in die Untersuchung miteinbezogen, die in den Jahren 1990 bis 1999 im Rahmen der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen aus eingesendetem Probenmaterial isoliert worden waren. Diese Isolate wurden durch biochemische und serologische Methoden auf ihre Identität überprüft. Sie wurden in LB-Medium mit 30 % Glycerin bei -80°C gelagert oder nach Plattenabschwemmung mit Serumbouillon (incl. 10 % Glucose) lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 4:** Verwendete Stämme von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica*.

Stamm	Serovar	wichtige Eigenschaften	Herkunft
9R Nobilis	Gallinarum	attenuierter Impfstamm; Rauhphase	B
21-92	Gallinarum	Feldisolat vom Huhn	B
72/805	Gallinarum	Feldisolat vom Huhn	B
287/91	Gallinarum	k. A.	B
421/101	Typhimurium	zur Belastungsinfektion von Mäusen, <i>spvD</i> <sup>+</sup>	IDT
442/012	Dublin	zur Belastungsinfektion von Mäusen, <i>spvD</i> <sup>+</sup>	IDT
491/93	Enteritidis	Feldisolat vom Pferd; PT 8/7	IHIT
1714/94	Gallinarum	Feldisolat vom Huhn	R
1909/93	Gallinarum	Feldisolat vom Huhn	R
1910/93	Gallinarum	Feldisolat vom Huhn	R
2501/98	Enteritidis	Feldisolat vom Pferd; PT 4	IHIT
2713/98	Enteritidis	Feldisolat vom Igel; PT 11b	IHIT
5304/98	Typhimurium	Feldisolat vom Pferd; DT 104H	IHIT
5441	Gallinarum	k. A.	B

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite.

Fortsetzung **Tabelle 4**

<b>Stamm</b>	<b>Serovar</b>	<b>wichtige Eigenschaften</b>	<b>Herkunft</b>
5441	Gallinarum	k. A.	B
5972/93	Typhimurium	Feldisolat vom Pferd; O5 <sup>-</sup> ; DT 204c	IHIT
6785/92	Typhimurium	Feldisolat vom Pferd; O5 <sup>-</sup> ; DT 204c	IHIT
ATCC 19585	Typhimurium	Referenzstamm	ATCC
ATCC 19945	Pullorum	Referenzstamm	ATCC
L-2508	Abortusequi	Feldisolat vom Pferd	A
LANE	Dublin	k. A.	G
P 100/93	Dublin	Feldisolat vom Rind	IHIT
P 108/93	Dublin	Feldisolat vom Rind	IHIT
SE 147	Enteritidis	zur Belastungsinfektion von Mäusen, <i>spvD</i> <sup>+</sup>	IDT
SG 9	Gallinarum	Elternstamm von Impfstamm 9R Nobilis	B
STm	Typhimurium	Markerplasmid: 60 MDa	BgVV
Ti 184/64	Gallinarum	k. A.	D
VA 1197/89	Pullorum	k. A.	VA-Z
x-250/99	Gallinarum	k. A.	R
x-7/93	Dublin	k. A.	D
x-115/97	Typhimurium	Feldisolat vom Rind; DT 68	VA-G
x-148/98	Typhimurium	Feldisolat von der Taube; O5 <sup>-</sup> ; DT 2	S
x-170/98	Gallinarum	k. A.	SGSC
x-200/98	Pullorum	k. A.	SGSC
x-201/98	Pullorum	k. A.	SGSC
x-249/99	Dublin	k. A.	RKI

**Erläuterung:** **A:** DVM PhD. M. Akiba, National Institute of Animal Health, Kagoshima, Japan; **ATCC:** American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; **B:** Dr. P. Barrow, Institut for Animal Health, Compton, UK; **D:** Dr. U. Dinjus, BgVV, Jena; **G:** Dr. D. G. Guiney, School of Medicine, University of California at San Diego, La Jolla, USA; **IDT:** Impfstoffwerk Dessau-Thornau GmbH, Roßlau; **IHIT:** Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen; **k. A.:** keine Angabe; **R:** Dr. W. Rabsch, RKI, Wernigerode; **RKI:** Robert-Koch-Institut, Berlin; **S:** Prof. Dr. S. Schwarz, Institut für Tierzucht und Tierverhalten an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Volkenrode (FAL), Celle; **SGSC:** *Salmonella* Genetic Stock Center, Calgary, Alberta, Kanada; **VA-G:** Dr. R. Gössler, Veterinäramt, Lauterbach; **VA-Z:** Dr. M. Zschöck, Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen.

**Tabelle 5:** Verwendete *E.coli* -Stämme.

Stamm	Beschreibung und relevante Eigenschaften	Herkunft
BLR(DE3)	K12-Derivat; F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> ( $r_B^- m_B^-$ ) <i>gal dcm</i> $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> ) <i>306::Tn10</i> (DE3)	N
R27	Markerplasmid: 112 MDa	BgVV
R478	Markerplasmid: 160 MDa	BgVV
RU244	BL21(DE3)/pHIT-II-3; K12-Derivat mit pET-15b:: <i>spvC</i>	IHIT
V517	Markerplasmide: 1,4/1,8/2,0/2,6/3,4/3,7/4,8/35,8 MDa	BgVV
x-109/98	Markerplasmid: 12,5 MDa	IHIT

**Erläuterung:** **BgVV:** Bundesministerium für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Wernigerode; **IHIT:** Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen; **N:** Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

### 3.1.3 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in der **Tabelle 6** aufgeführt.

**Tabelle 6:** Verwendete Plasmide.

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft
pET-24b(+)	5310 bp, pBR322 origin, f1 origin, <i>lacI</i> , Kan <sup>r</sup> , T7 Promotor, T7 Transkriptionsstart, T7 Terminator, His-Tag Kodierungssequenz	Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
pHIT-IV-2	pET-24b(+>:: <i>spvD</i> , 5918 bp, <i>lacI</i> , Kan <sup>r</sup>	vorliegende Arbeit

### 3.1.4 Impfstoff

Säulenchromatographisch aufgereinigtes rSpvD-His wurde zweimal für 24 h gegen Coating-Puffer-Gebrauchslösung dialysiert und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Applikation an das Tier wurde die Lösung mit demselben Volumen inkomplettes Freundsches Adjuvans (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) homogen vermischt. Eine Impfdosis enthielt 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 1200 µl.

### 3.1.5 Tiere

**Mäuse.** Es wurden sechs Wochen alte, 12-16 g schwere, weibliche BALB/c-Mäuse (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln) für das Mausinfektionsmodell verwendet.

**Kaninchen.** Ein weibliches Kaninchen der Rasse Weißer Neuseeländer im Alter von 6-8 Wochen (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln) wurde zur Herstellung des Hyperimmunserrums gegen rSpvD-His verwendet.

**Pferde.** Die in dieser Arbeit verwendeten 127 Pferdeseren stammten von Pferden, die zur Zeit der Probennahme (1990-1998) auf Gestüten in Deutschland standen oder als Patienten in den veterinärmedizinischen Kliniken der Justus-Liebig-Universität Gießen aufgenommen waren. Das Alter der Tiere betrug zwischen einer Woche und 21 Jahren (**142**).

### 3.1.6 Blutproben

Blutproben von Pferden und Kaninchen wurden durch Punktion aus geeigneten Venen entnommen: bei Pferden aus der *Vena jugularis* und bei Kaninchen aus der *Vena auricularis caudalis*. Blutentnahmen bei Mäusen wurden ausschließlich unter Vollnarkose durch Eröffnung der Halsgefäße durchgeführt. Das Vollblut wurde eine Stunde bei RT (das Blut von Mäusen über Nacht bei 4°C) inkubiert und dann das Serum nach Zentrifugation (1.270 x g, 10 min, RT) abgenommen. Die Seren wurden bei -20°C gelagert.

## 3.2 Bakteriologische Methoden

### 3.2.1 Anzucht von Bakterien

**Standardanzucht.** Bakterien wurden in dem jeweiligen Nährmedium aerob für 12-16 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Modell GFL 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) mit 180 U/min angezüchtet.

**Transformierte *E.coli*-Zellen.** Der *E.coli*-Stamm BLR(DE3)/pHIT-IV-2 wurde für 12-16 h bei 30°C mit 180 U/min in LB-Medium angezüchtet. Dem Medium wurde Tetrazyklin (Endkonzentration 12,5 µg/ml, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) und Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/ml, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) zugesetzt.

**Induktion transformierter *E.coli*-Zellen.** Zur Herstellung des rekombinanten Proteins rSpvD-His wurde der *E.coli*-Stamm BLR(DE3)/pHIT-IV-2 gemäß der Standardanzucht in LB-Medium kultiviert. Nachdem die Suspension 1:100 (v/v) mit frischem LB-Medium verdünnt worden war, wurde die Kultur bis zum Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 weiter inkubiert. Zur Induktion wurde der Kultur dann Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG, Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) bis zu einer Endkonzentration von 15,6 µM zugegeben.

### 3.2.2 Salmonellen-Nachweisverfahren

**Qualitatives Nachweisverfahren.** Der Isolierung von Salmonellen aus den an das Diagnostiklabor des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen gesandte Proben erfolgte mittels einer 24- und 48-stündigen Anreicherung in flüssigem Tetrathionat- und Rappaport-Vassiliadis-Medium (Fa. Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) bei jeweils 37°C und 43°C. Der Ausstrich aus dem Anreicherungsmedium wurde auf Schafblut-, Gassner- (Fa. Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) und BPLS-Agar (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) angelegt (**309**).

**Biochemische Eigenschaften und Beweglichkeit.** Salmonellenverdächtige Kolonien wurden biochemisch auf ihre Gattungszugehörigkeit geprüft. Hierbei wurden die folgenden biochemische Eigenschaften untersucht:

- auf Schrägagar: oxidativer und fermentativer Glucoseabbau, Phenylalanin-Desaminase und H<sub>2</sub>S-Produktion (mittels Kligler-Agar), Ureaseaktivität (mit Agar nach Christensens), Citrat-Utilisation (mit Agar nach Simmons);
- in halbflüssigem Medium: Beweglichkeit (Hitchens-Agar);
- in Agar mit Gelatinezusatz: Gelatinase-Aktivität;
- in Flüssigmedien: Glucoseabbau mit Säure- und Gasbildung, Lactose-, Mannose-, Inosit- und Saccharoseabbau mit Säurebildung, Acetoin-Produktion (Voges-Proskauer-Reaktion), Indol-Produktion, aerobe und anaerobe Ornithin-Decarboxylierung, Lysin-Decarboxylierung, Nitratreduktion und Dextrose-Spaltung (Methylrot-Reaktion) (**128**).

**Serotypisierung.** Die serologische Typisierung von Salmonellen erfolgte mittels Objektträger-Schnell-Agglutination (OSA), wobei omnivalente, polyvalente und O-Gruppen spezifische Testseren der Fa. Behring, Marburg eingesetzt wurden. Insgesamt 114 nicht eindeutig typisierbare Stämme wurden von dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin und Wernigerode serotypisiert.

**Bestimmung des Lysotyps.** Die Bestimmung der Lysotypen wurde durch Mitarbeiter des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin in Berlin und Wernigerode durchgeführt.

**Quantitative Nachweisverfahren.** Im Infektionsversuch an Mäusen wurde die Anzahl der Salmonellen in Leber und Milz quantitativ bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Leber und Milz nach der Euthanasie der Tiere steril entnommen. Die Organe wurden gewogen und unter Zugabe von 1 x PBS (1 ml zur Leberprobe, bzw. 0,5 ml zur Milzprobe) mit einem Mörser und sterilem Sand homogenisiert. Mit dieser Suspension wurde dann eine Bestimmung der

Keimzahl nach dem Tropfplattenverfahren sowie eine *Salmonella*-spezifische Anreicherung in Rappaport-Vassiliadis- und Tetrathionat-Medium durchgeführt. Nach Bebrütung der Platten für 16 h bei 37°C wurden die Kolonien ausgezählt. Für die Auswertung erfolgte die Berechnung der KbE auf 1 g Organmasse.

### 3.2.3 Keimzahlbestimmung

**Photometrische Bestimmung.** Die optische Dichte von Keimsuspensionen wurde in einem Beckman Photometer des Typs DU-640 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, USA) bei 600 nm bestimmt. Eingesetzt wurde 1 ml der zu bestimmenden Keimsuspension. Die koloniebildenden Einheiten (KbE) wurden dann mit der Formel

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = \text{OD}_{600\text{ nm}} \times 10^9$$

berechnet. Zur Kontrolle dieser Vorgehensweise wurden in regelmäßigen Abständen Keimzahlbestimmungen nach dem Tropfplattenverfahren durchgeführt.

**Tropfplattenverfahren.** Die Keimzahlbestimmung im Tropfplattenverfahren erfolgt in Anlehnung an die „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG“ (10). Nach Standardanzucht einer Bakterienkultur in MH-Bouillon wurde die Suspension 1:100 (v/v) in frischem Medium verdünnt und für weitere 2 h (180 U/min, 37°C) inkubiert. Nach Messung der  $\text{OD}_{540\text{ nm}}$  wurde eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe in steriler, physiologischer NaCl-Lösung angelegt. Je Verdünnungsstufe wurden zweimal 10 µl auf eine Blut-Agar-Platte aufgetropft und über die Platte verteilt. Die Platten wurden für 16 h bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden diejenigen Platten ausgewertet, bei denen ca. 10 bis 300 Kolonien gut abgrenzbar waren. Die Keimzahl in der Ausgangsbouillon wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = (\text{ausgezählte Kolonien} \times 100) \times \text{Verdünnungsstufe.}$$

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Präparation von DNS

**Plasmid-DNS.** Präparation von Plasmid-DNS wurde gemäß den Anweisungen der Fa. Qiagen, Hilden, mit dem „Plasmid Midi Kit“ durchgeführt. Hierzu wurde der benötigte Stamm in 25 ml Kultur nach dem Standardverfahren angezüchtet. Nach dem Zentrifugieren (6.000 x g, 5 min, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, 4 ml Puffer P2 zugegeben und der Reaktionsansatz nach Mischen für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P3 erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Dann wurde bei 20.000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Die Säule wurde mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert, so daß

nach der Zentrifugation der Überstand vorsichtig abgenommen und auf die Säule aufgetragen werden konnte. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen. Dann erfolgte die DNS-Elution mit 5 ml Puffer QF. Anschließend wurde die Plasmid-DNS mit Isopropanol gefällt, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen.

Zur Bestimmung von Plasmidprofilen und zur Gewinnung von DNS für die Hybridisierungsanalysen wurde Plasmid-DNS nach dem modifizierten Verfahren von **KADO & LIU** (1981) präpariert. Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium überimpft und über 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (12.000 x g, 4 min). Das Bakterienpellet wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 100 µl frisch angesetztem Lysepuffer versetzt. Nach 25 min Inkubation im Wasserbad bei 58°C wurde die Lösung mit 100 µl Chloroform/Phenol homogen gemischt. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 15 min) wurden 90 µl des Überstandes mit der DNS in ein neues Gefäß überführt (**143**). Zur Auftrennung der Plasmide wurde ein Aliquot dieses DNS-Präparates 4,5 : 1 (v/v) mit Loading Buffer versetzt und hiervon 20 µl auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Für Hybridisierungen im Dot-Blot-Verfahren wurden 20 µl des Plasmid-DNS-Präparates eingesetzt.

**Genomische DNS.** Zum Einsatz von genomischer DNS in PCR-Ansätzen wurden 50 µl einer für 16 h bei 37°C inkubierten Bakterienkultur mit 100 µl A.dest. versetzt und für 10 min bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

### 3.3.2 DNS-Bestimmung

**Photometrische Bestimmung.** Die Bestimmung von DNS erfolgte in einem Beckman Photometer des Typs DU-640 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, USA) wobei die Konzentration der DNS nach der Formel

$$\text{ssDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320 \text{ nm}} - \text{OD}_{260 \text{ nm}}) \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

bzw.

$$\text{dsDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320 \text{ nm}} - \text{OD}_{260 \text{ nm}}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

errechnet wurde.

**Agarosegelelektrophorese.** Bei der Bestimmung der DNS-Menge durch Agarosegelelektrophorese wurden als Marker der „100 bp Ladder“ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) oder „ $\lambda$ -HindIII/EcoRI“ (Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) auf dem Agarosegel mitgeführt. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der einzelnen Markerbanden mit der Probenbande konnte dann die DNS-Konzentration des fraglichen DNS-Fragments unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge des Markers abgeschätzt werden.

### 3.3.3 Restriktion von DNS

Die Restriktion von DNS wurde stets im Einzelverdau durchgeführt. Der *EcoRI*-Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 35 µl beinhaltete 2 x One-Phor-All Buffer Plus (Fa. Pharmacia, Freiburg), 200 ng/µl bzw. 100 ng/µl DNS und 10 U *EcoRI* (Pharmacia, Freiburg). Die Inkubation wurde über 16 h bei 37°C durchgeführt. Für die Restriktion mit dem Enzym *NdeI* (Fa. Amersham Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig) enthielt der Ansatz je nach Ausgangsvolumen (20 bzw. 35 µl *EcoRI*-Verdau) 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM K-Acetat, 1 mM DTT und 1 bzw. 2 U *NdeI*. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Die DNS-Fragmente wurden anschließend mittels einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und einer alkoholischen Fällung wie folgt aufgereinigt. Jeder Ansatz wurde mit 0,5 Vol Phenol und mit 0,5 Vol Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) versetzt und durch Stürzen der Gefäße gründlich gemischt. Nach dem Zentrifugieren (14.000 x g, 5 min, RT) wurde der wässrige Überstand gewonnen und mit 1/11 Vol Na-Acetat (3 M) und 3 Vol absolutem Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation (12.000 x g, 30 min, RT) wurde das Pellet mit 100 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000 x g, 5 min). Abschließend wurde das Pellet für 4 min in einem Exsikkator getrocknet und in einer äquivalenten Menge A.dest. oder TE-Puffer gelöst.

Die Aufreinigung einzelner Restriktionsfragmente wurde mittels Agarosegelelektrophorese und dem "Prep-A-Gene DNA Purification Kit" (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

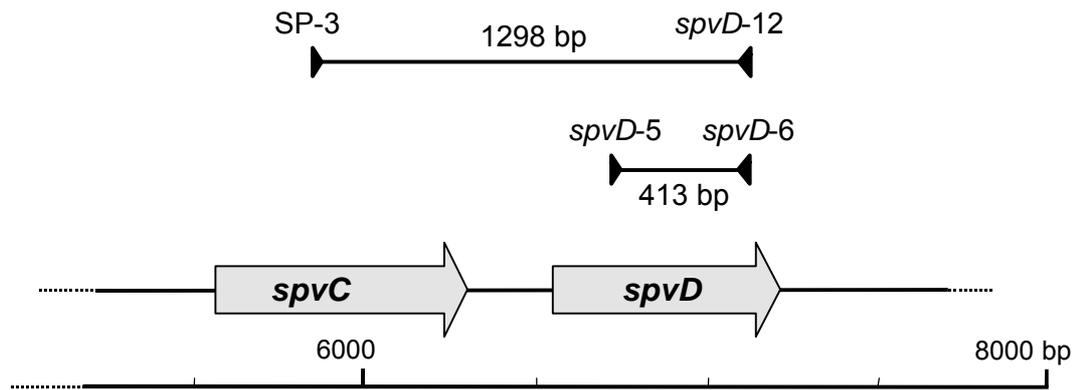
### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

**Oligodesoxyribonukleotide.** Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg, der Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, und der Fa. Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, UK, bezogen. Die Primer pET-A/-B lagen in 32 %-iger AmmoniakstammLösung im Institut vor und wurden wie folgt gefällt: 100 µl ammoniakalischer Primerlösung wurden mit 1 ml n-Butanol gemischt und zentrifugiert (14.000 x g, 4 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 100 µl TE-Puffer gelöst und die Fällung mit n-Butanol wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet, in 100 µl A.dest. aufgenommen und eine DNS-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Alle Primer wurden in A.dest. gelöst, auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt und anschließend bei -20°C gelagert. Die Sequenzen der Primer und andere wichtige Eigenschaften sind in der **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation			Quelle	
		Organismus	Gen / Region	Position <sup>1)</sup>	Datenbank	Datenbank-Nr.
<b>pET-A</b>	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	<i>E. coli</i>	pET-24b(+)	64-88	Fa. Novagen	pET-24b(+)
<b>pET-B</b>	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC	<i>E. coli</i>	pET-24b(+)	<u>314-337</u>	Fa. Novagen	pET-24b(+)
<b>SP-3</b>	GCTCGTCGAGAATCACCTC	<i>S. Tm</i>	<i>spvC</i>	5839-5857	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvC-9</b>	TGCGTCGTTTCTCCACAAG	<i>S. Tm</i>	<i>spvC</i>	6081-6099	EMBL/Genbank	x56727
<b>CD-1</b>	TATGTCCGCACTGTAATGG	<i>S. Tm</i>	<i>spvC/spvD</i>	6458-6476	EMBL/Genbank	x56727
<b>spvD-3</b>	TTATTGAGGTAGTGTACATATGAGAGTTTC	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	6542-6572	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-4</b>	ATGAATATTTAAACCGAATTCGAATCGTGTTTTTC	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	<u>7197-7237</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-5</b>	ATCCACAAAATTTGAGTCGAG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	6697-6714	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-6</b>	AGAATCAATGAATTGTACATATGG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	<u>7086-7109</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-7</b>	GGTGGAAAAAGAAATATTAACC	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	6944-6966	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-8</b>	GGAGAGGCAGTGTTCTTCG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	<u>6838-6856</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-9</b>	CAAGAAATAAAAAACACTTCTC	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	7140-7162	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-10</b>	TTAATTCTCTTGACTTCATTTG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	<u>6659-6637</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>spvD-12</b>	GCTAGGAAGTATGTTGGATG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD</i>	<u>7117-7136</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>DE-1</b>	GAGATGGATGGTGAACAAG	<i>S. Tm</i>	<i>spvD/orfE</i>	<u>7563-7581</u>	EMBL/GenBank	x56727
<b>orfE-2</b>	GCCGTGTCGTTGATAAGCG	<i>S. Tm</i>	<i>orfE</i>	<u>7934-7952</u>	EMBL/Genbank	x56727

**Erläuterung:** 1) Die Positionsangaben folgen der Nummerierung und Angaben der Datenbankeinträge. Gegenstrang-Primer sind durch Unterstreichung gekennzeichnet;  
 2) **S. Tm** = *Salmonella* Typhimurium.



**Abbildung 4:** Grafische Darstellung der kreierte DNS-Sonden und ihrer Bindungsstellen im *spv*-Locus von *Salmonella* Dublin LANE (GenBank-Eintrag X56727).  
 □ = Gen; ┌─┐ = DNS-Sonde.

**Standard-PCR.** Standard-PCRs mit den Primerpaaren pET-A/pET-B und *spvD*-5/*spvD*-6 wurden mit der *Thermus flavus* (*Tfl*)-DNA-Polymerase (Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) durchgeführt. Der 25 µl Reaktionsansatz enthielt 1 x *Tfl*-PCR-Puffer (Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf), 0,25 U *Tfl*-Polymerase, Primer in einer Endkonzentration von 1 µM, Nukleotide in einer Endkonzentration von 200 µM je Nukleotid und 5 µl DNS-Lösung. Die Kettenreaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung bei 94°C (5 min), dann 30 Zyklen mit je 1 min bei 94°C, 1 min bei 59°C und 1 min bei 72°C. Abschließend wurden die Proben 3 min bei 72°C inkubiert (Cycler 9600, Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Überlingen).

**Markierungs-PCR.** Markierte Gensonden wurden mittels PCR hergestellt. Die Lage der Sondenzielsequenzen im *spv*-Locus ist der **Abbildung 4** zu entnehmen. Der Reaktionsansatz enthielt: 1 x *Tfl*-PCR-Puffer (Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf), 0,5 U *Tfl*-Polymerase, Primer in einer Enkonzentration von je 1 µM, die Nukleotide dATP, dCTP und dGTP (Fa. AGS, Heidelberg) von je 200 µM, dTTP (Fa. AGS, Heidelberg) in einer Konzentration von 160 µM, Dig-11-UTP (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Endkonzentration von 33 µM und 10 µl genomische DNS. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 5 min Denaturierung (94°C), dann 30 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung (94°C), 30 sek Annealing (55°C) und 2 min 30 sek Extension (72°C). Abschließend folgte noch ein Zyklus von 5 min bei 72°C. Die Herstellung und die Markierung der Gensonden wurden anhand der verminderten elektrophoretischen Mobilität im Agarosegel überprüft. Die Sonden wurden bis zu Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Hybridisierung wurden 6 µl PCR-Ansatz in 10 ml Hybridisierungslösung aufgenommen.

### 3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Gemischen erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 0,5 - 3 % (w/v) Agarose (Rotigarose, Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und 1 x TAE als Laufpuffer. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für ein bis 16 Stunden angelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Standard „1-Kb-Ladder“ (Fa. Life Technologies GmbH, Eggenstein) mitgeführt. Anschließend wurde die DNS in Ethidiumbromid-Bad (10 mg/ml) angefärbt und mit UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht (UVT-20M/W, Fa. Herolab GmbH, Wiesloch). Bei der Auftrennung von zirkulären Plasmiden wurden die Plasmid-DNS-Präparate der *E.coli*-Stämme V517, R27, R478 und x-109/98 und des *Salmonella*-Stammes STm als Standard mitgeführt. Bei präparativer Agarosegelelektrophorese wurde Low Melting Agarose (NuSieve® GTG® Agarose, Fa. FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) in 0,8 %-iger Konzentration eingesetzt.

### 3.3.6 DNS-DNS-Hybridisierung

**Dot-Blot.** Die positiv geladene Nylonmembran (Typ 1417240, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde erst in A.dest., dann in 2 x SSC getaucht und danach auf einem mit A.dest. befeuchteten Filterpapier in den Dot-Blot-Apparat (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingespannt. Die DNS-Proben wurden 10 min gekocht, auf Eis gekühlt und mit Hilfe des Gerätes durch Unterdruck punktförmig auf die Membran aufgebracht. Zur Fixierung der DNS an die Matrix wurde die Membran für 30 min bei 80°C gebacken und anschließend mit UV-Licht bestrahlt (3 J/cm<sup>2</sup> auf die Oberseite und 1,5 J/cm<sup>2</sup> auf die Unterseite; Stratalinker™ 1800, Fa. Stratagene, Heidelberg).

**"Downward Southern"-Blot.** Der Transfer von DNS aus Agarosegelen auf Membranen erfolgte im Kapillarblotverfahren nach Southern in der „Downward“-Modifikation nach **CHOMCZYNSKI** (1992). Hierbei wurde die DNS mittels Elektrophorese in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Färben der DNS mit Ethidiumbromid und dem Photographieren wurde das Gel in einem Stratalinker™ 1800 UV-Licht mit einer Energiedichte von 60 mJ/cm<sup>2</sup> ausgesetzt. Dann wurde die doppelsträngige DNS durch zweimaliges Schwenken in 0,25 M HCl für 15 min und anschließendes Schwenken für 30 min in Denaturierungslösung depuriniert. Die Nylonmembran (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde 20 min in A.dest. äquilibriert. Der Aufbau des Transfersystems entsprach dem folgenden Prinzip: auf eine ca. 10 cm dicke Schicht aus saugfähigem Papier folgten zwei trockene Filterpapiere, zwei in Transferlösung getränkte Filterpapiere (GB 022 Gel Blotting Paper, Fa. Schleicher & Schuell, über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf), dann die äquilibrierte Nylonmembran, das Agarosegel, nochmal vier in Transferlösung getränkte Filterpapiere und schließlich zwei Pa-

pierbrücken aus Filterpapier deren Enden in das Reservoir der Transferlösung eintauchten. Der Transfer wurde über zwei Stunden bei RT durchgeführt. Beim Abbau des Systems wurde die Position der Slots auf der Nylonmembran mit einem Stift markiert. Die Gele wurden zur Kontrolle erneut mit Ethidiumbromid gefärbt um den vollständigen Transfer der DNS auf die Membran zu überprüfen. Die Membran wurde für 10 min in Neutralisationslösung geschwenkt und dann für 15 min bei RT auf einem Filterpapier getrocknet. Die Fixierung der DNS auf der Membran erfolgte durch Backen bei 120°C für 30 min (57).

**DNS-DNS-Hybridisierung.** Die Hybridisierung von DNS mit Digoxigenin-markierten DNS-Gensonden und die Chemilumineszenz-Detektion der DNS-DNS-Hybride erfolgte mit dem "DIG luminescent detection kit" (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Hierzu wurde die Membran in verschraubbare Glasröhren plaziert und nach Zugabe von 25 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm<sup>2</sup> Membran 1 h bei 42°C in einem "Maxi Hybridisation Oven" (Fa. Hybaid Limited, Teddington, Middlesex, USA) prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die in Hybridisierungslösung aufgenommene DNS-Sonde für 10 min auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die in der Glasröhre befindliche Hybridisierungslösung wurde dann verworfen, durch mit Sonde versetzte Hybridisierungslösung ersetzt und die Röhre für weitere 16 h bei 42°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend entnommen und in einer verschlossenen Plastikschaale bei RT unter ständigem Schwenken zweimal für je 5 min nichtstringent in DNS-Waschlösung 1 gewaschen. Das stringente Waschen des Blots wurde bei 65°C für zweimal 15 min mit DNS-Waschlösung 2 durchgeführt.

**Detektion.** Alle Schritte zur Sichtbarmachung von DNS-DNS-Hybriden wurden bei RT unter ständigem Schwenken des Blots durchgeführt. Nach 5 min Waschen in DNS-Waschpuffer wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation für 30 min in Detektionspuffer 2 geblockt. Zur Immundekoration wurde die Membran für 30 min in Detektionspuffer 2 mit "Anti-DIG-AP-Fragment" [Verdünnung 1:10.000 (v/v), Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim] geschwenkt. Danach folgten zwei Waschdurchgänge von je 15 min mit Waschpuffer. Als Substrat kam Lumigen PPD/CSPD (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) in Detektionspuffer 3 zur Anwendung, in der der Blot für 5 min inkubiert wurde. Zur Visualisierung des Chemilumineszenzsignals wurde der Blot in einen Klar-sichtkunststoffbeutel eingeschweißt, 10 min bei 37°C inkubiert und für 1 Stunde auf einem Röntgenfilm (Cronex<sup>®</sup> Medical X-Ray Film 4, Fa. Sterling Diagnostic Imaging Inc., durch Fa. Siemens, Erlangen) exponiert.

### 3.3.7 DNS-Klonierung

**Ligation.** Die sticky-end Ligation der restringierten DNS-Fragmente wurde in Ligationsansätzen mit 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Sie enthielten 1 x Ligationspuffer (Fa. USB),

0,5 U T4-Ligase (Fa. USB) und 733 ng DNS in einem molaren Verhältnis von 1:7 von Vektor:Insert. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 4°C (**250**).

**Kompetente *E.coli*-Zellen.** Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach dem Verfahren von **HAHNAHAN** (1983) in modifizierter Form. Die Keime wurden für 16 h bei 37°C angezüchtet. Diese Kultur wurde dann 1:100 (v/v) mit frischem LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 weiter inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 5 min, 4°C) und in eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, um anschließend in TFB II-Puffer resuspendiert und à 100 µl bei -80°C gelagert zu werden (**112**).

**Transformation.** Zur Transformation wurden die Zellsuspensionen auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeimpuls von 90 sek bei 42°C wurde die Zellsuspension erneut für 2 min auf Eis gelagert. Danach wurde sie mit 4 Vol LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert und für 16 h bei 37°C inkubiert.

### 3.3.8 DNS-Sequenzierung

Als Matrize für die Sequenzierungsreaktion wurden ausschließlich gereinigte PCR-Amplifikate verwendet. Zur Aufreinigung von PCR-Amplifikaten für Sequenzierungen wurde das PCR-Produkt mit 1 M NaClO<sub>4</sub> und Isopropanol 1:1:1 (v/v/v) gemischt. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 20 min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, für 4 min in einem Exsikkator getrocknet und in 10 µl A.dest. gelöst. In der Sequenzierungs-PCR wurden pro 100 bp zu sequenzierendes Amplifikat 7,0 ng DNS eingesetzt. In dem 20 µl Ansatz befanden sich neben der DNS 0,24 µM des Primers und 8,0 µl des Prämixes aus dem Kit "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing" (Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Überlingen). Die so erzeugten Fragmente wurden mittels Phenol/Chloroformextraktion sowie einer alkoholischen Fällung isoliert (siehe **3.3.3**) und über ein vertikales 6,5 %-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ablesung des Bandenmusters und die Übersetzung in eine Nukleotidsequenz erfolgte automatisch mit dem Sequenziergerät Modell 373A der Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems, Überlingen.

Die Sequenzierung von Nukleotidsequenzen wurde ab Februar 2000 durch Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Genomics, der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

## 3.4 Proteinanalytische Methoden

### 3.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem "BCA Protein Assay Kit" (Fa. Pierce, Rockford, Illinois, USA) nach der "Bicinchoninic-Acid-(BCA)"-Methode zur kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen. Der Test wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die optische Dichte des Reaktionsansatzes bei 562 nm wurde mit einem Beckman Photometer DU 640 (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, USA) ermittelt.

### 3.4.2 SDS-PAGE

**Analytische SDS-PAGE.** Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler SDS-PAGE nach LÄMMLI (1970). Hierbei wurden die Proteine in einem 1 mm dicken, 5 %-igen Polyacrylamidsammegel und einem 12,5 %-igem vertikalen Polyacrylamidtrenngel über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm bei 12,5 Ampere / Gel über 1,5 Stunden aufgetrennt (158). Zur Bestimmung der Molmasse der Proteine wurde der Marker „SeeBlue™ pre-stained standard“ der Fa. Novex Elektrophoresis GmbH, Frankfurt, mitgeführt.

Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte entweder durch Anfärben mit Coomassie-Brilliant-Blau-G250-Färbelösung, in die die Gele für 1 h eingelegt wurden oder durch die Bio-Rad-Silberfärbung (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Zur Haltbarmachung wurden die Polyacrylamidgele auf Filterpapier gelegt und unter Vakuum für 2 h bei 80°C getrocknet.

**Präparative SDS-PAGE.** Zur weiteren Aufreinigung des rekombinanten Proteins rSpvD-His wurde nach der säulenchromatographischen Reinigung die präparative SDS-PAGE mit einer PrepCell®-Apparatur (Modell 491, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt. Diese Methode macht sich die Prinzipien der SDS-PAGE zunutze, wobei die im Verlauf der Elektrophorese aufgetrennten Proteine nach einer effektiven Trennstrecke von 6 cm bei Austritt aus dem zylindrischen, vertikalen Gel von einem horizontal verlaufenden Pufferstrom aufgenommen werden, der danach fraktioniert gesammelt wird. Der Verlauf der Elution wurde mit einem UV-Photometer LKB Bromma 2158 Uvicord SD der Fa. Pharmacia, Freiburg, (Messung der optischen Dichten bei 278 nm) überwacht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer gleich bleibenden Stromstärke von 40 mA über 3,5 bis 5 h. Für den Auftrag der Proben wurden 270 µl Tris-Cl (0,5 M pH 6,5), 216 µl Glycerin, 432 µl SDS (10 %), 50 µl β-Mercaptoethanol, 10 µl Bromphenolblau (0,1 %), max. 1 ml Proteinfraction und A.dest. ad

2560 µl vermischt. Anschließend wurde die Probenlösung für 10 min bei 100°C gekocht und auf die Gelsäule aufgetragen.

### 3.4.3 Löslichkeitsanalyse von *E.coli*-Proteinen

Die Präparation der löslichen Proteinfractionen im *E.coli*-Bakterienzellysat erfolgte nach den Anweisungen im pET-Manual (7<sup>th</sup> edition, Fa. Novagen durch Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Präparate wurden anschließend mittels analytischer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Das Trennergebnis wurde photographisch dokumentiert, digitalisiert und danach densitometrisch ausgewertet.

### 3.4.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix

**Bakterienzellyse.** Die IPTG-induzierten *E.coli*-Bakterien wurden nach sechs Stunden Inkubation für 10 min auf Eis gelagert, anschließend bei 5.000 x g abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Zur Lyse wurden die Bakterien in Lysispuffer mit 1 mg/ml Lysozym und 1 mM PMSF resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (9.000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert (6.000 x g, 10 min, 4°C) und abschließend bei 4°C gelagert.

**Affinitätschromatographie.** Das Keimlysat wurde mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Fa. Qiagen, Hilden) gemischt und unter Rühren inkubiert (1 h, 4°C). Anschließend wurde das Gemisch zur Säule gepackt (Ø 1,6 cm, Höhe 2 cm) und mit Waschpuffern aufsteigender Imidazol-Konzentrationen (5 mM, 30 mM und 45 mM) gewaschen (jeweils 2 x 10 ml). Das rSpvD-His wurde dann mit zwei Puffern (jeweils 4 x 2 ml), die eine Imidazol-Konzentration von 100 mM bzw. 500 mM besaßen, fraktioniert eluiert. Die weitere Aufreinigung von rSpvD-His erfolgte mittels präparativer SDS-PAGE.

### 3.4.5 Entsalzung von Proteinfractionen

**Dialyse.** Fraktionen, die das gewünschte Histidin-markierte Fusionsprotein enthielten, wurden in einem Dialysierschlauch (Type Visking 27/32, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) zweimal gegen je 2 l Coating Puffer für 24 h bei 4°C dialysiert. Mittels Einlegen der Schläuche in PEG-40.000 für 1 h wurde die Proteinlösung in ihrem Volumen eingengt und anschließend bei -20°C gelagert.

**PD-10-Säulen.** Kleine Probenvolumina (bis 2,5 ml) wurden mittels PD-10-Säulen der Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg, aufgereinigt. Diese waren mit jeweils 9,1 ml Sephadex<sup>®</sup> G-25M gepackt. Nach Äquilibrierung der Säule mit Coating Puffer (25 ml) erfolgte der Probenauf-

trag. Die Elution erfolgte mit je 4 ml Coating Puffer. Das Eluat wurde jeweils in 1 ml-Fraktio-  
nen gesammelt. Die anschließende Reinigung der Säule wurde mit 25 ml Coating Puffer  
durchgeführt.

## 3.5 Serologische Methoden

### 3.5.1 Konjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper und ihre Gebrauchsverdünnungen sind  
in der **Tabelle 8** aufgeführt.

**Tabelle 8:** Verwendete Konjugate.

Konjugat	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
<b>Ziege-Anti-Pferd-IgG-POD</b>	1:80.000	Katalog-Nummer 108-036-003; Fa. Jackson Immuno Research Laboratories Inc., über Fa. Dianova, Hamburg
<b>Esel-Anti-Kaninchen-Ig-POD</b>	1:10.000	Katalog-Nummer NA 934; Fa. Amersham Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig
<b>Schaf-Anti-Maus-Ig-POD</b>	1:5.000	Katalog-Nummer NA 931; Fa. Amersham Buchler GmbH & CoKG, Braunschweig
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-HRP</b>	1:1.000	Katalog-Nummer 34530; Fa. Qiagen, Hilden

### 3.5.2 Immunoblot / Westernblot

Proteine wurden mittels analytischer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Transfer auf eine  
Fluorotrans-Membran (Fa. Pall GmbH, Dreieich) erfolgte in der Blotkammer (Modell LKB  
Bromma 2217 Multiphor II Electrophoresis Unit, Pharmacia, Freiburg). Auf die Anodenplatte  
wurden vier mit Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere (GB 022 Gel Blotting Paper, Fa.  
Schleicher & Schuell, über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf) gelegt, darauf zwei mit Anoden-  
puffer II getränkte Papiere. Hierauf wurde die Membran plaziert, auf die das Gel aufgebracht  
wurde. Abschließend kamen noch sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere auf das  
Paket. Der Transfer wurde für 2,5 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel durchgeführt. Dann wurde das  
System wieder abgebaut und die Membran für 16 h bei RT in PBS geschwenkt. Danach wur-  
de die Membran in Blockierungsreagenz (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 1:10  
[v/v] in A.dest. verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 20 ml

PBS-Tween, wurde die Membran in die mit PBS-Tween verdünnten Serumproben (Inkubation: 1 h, RT) eingelegt. Nachfolgend wurde der Blot erneut wie oben beschrieben gewaschen, bevor die Peroxidase-markierten, klassenspezifischen Antiseren (verdünnt in PBS-Tween) zugesetzt und mit dem Blot für 1 h bei RT inkubiert wurden. Vor der Zugabe des Substrats wurde der Blot dreimal mit je 20 ml 1 x PBS gewaschen. Die Membran blieb der Substratlösung (3 ml Chloronaphtol, 7 ml PBS und 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für bis zu 30 min bei RT ausgesetzt, bevor die Zugabe von A.dest. die enzymatische Reaktion beendete.

### 3.5.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Es wurden drei verschiedene ELISAs durchgeführt. Einerseits ELISAs mit den Antigenen rSpvD-His oder Bakterienzellysate von *Salmonella enterica*-Stämmen, sowie andererseits ein ELISA mit Lipopolysaccharid-Präparationen von *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis* (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). In der **Tabelle 9** sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung der ELISAs beschrieben. Zwischen den Schritten 1 bis 5 wurden die Näpfe jeweils dreimal mit 300 µl PBS-Tween/Napf mit einem 96-Napf-Pipettierer (Modell Costar® Transtar, Fa. Corning GmbH Life Sciences, Wiesbaden, über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf) gewaschen. Die Messung der optischen Dichte (OD<sub>492 nm</sub>) wurde unmittelbar nach dem Abstoppen der Reaktion mit dem Titertek®-Multiskan-Plattenphotometer (Modell MCC340, Fa. Flow Interlab GmbH, Meckenheim) bzw. dem Multiskan Ascent (Fa. Lab-systems Oy, Helsinki, Finnland; Software Version 2.3) vorgenommen.

Als Kontrollen für den ELISA wurden dabei auf jeder Platte mitgeführt:

**Blank** = 0-Wert. Näpfe wurden bis zu Schritt 4 jeweils nur mit PBS-Tween gefüllt, in Schritt 5 und 6 aber mit dem Substrat und mit Stöplösung.

**Konjugatkontrolle.** Entsprechende Näpfe durchliefen die Schritte 1, 2, 4-6 der Arbeitsvorschrift in **Tabelle 9**. Bei Schritt 3 wurde anstelle einer Serumprobe PBS-Tween in die Näpfe gegeben, um die Bindung des Sekundärantikörpers an das Antigen zu kontrollieren. Die OD<sub>492 nm</sub> dieser Näpfe durfte den Wert von 0,070 nicht überschreiten.

In dem ELISA zum Nachweis von SpvD-Antikörpern in Pferdeserumproben wurde auf jeder Platte ein **Standardserum** mitgeführt, welches in Vorversuchen ermittelt worden war. Die gemessenen optischen Dichten wurden anschließend in Titer wie folgt umgerechnet:

$$\text{IgG-Titer [\% des Standards]} = \frac{\text{OD}_{492 \text{ nm}} \text{ der Serumprobe}}{\text{OD}_{492 \text{ nm}} \text{ des Standards}} \times 100 \%$$

**Tabelle 9:** Arbeitsschritte zur Durchführung eines ELISAs.

Arbeitsschritt	rSpvD-His-ELISA und Bakterienzellysat-ELISA	LPS-ELISA
<b>1. Beschichtung</b>	<b>Nunc-Immuno™ Plates</b> , Polysorb 96-U-Platte (Fa. Nunc, über Fa. Fisher Scientific GmbH, Nidderau) 400 ng rSpvD-His/150 µl Coating Puffer/Napf , bzw. 500 ng BZL/150 µl Coating Puffer/Napf (16 h, RT)	<b>Medium Binding 96-U-Mikrotiterplatte</b> (Fa. Greiner, Nürtingen) 500 ng LPS/125 µl PBS mit 0,2 % TCA /Napf (16 h, 37°C)
<b>2. Blocken freier Bindungsstellen</b>	<b>Blockierungsreagenz</b> (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:10 in A.dest verdünnt, mit 200 µl/Napf (1 h, 37°C)	entfällt
<b>3. Bindung der Primärantikörper</b>	<b>Serumproben</b> (ein- bis dreifacher Ansatz) in PBS-Tween verdünnt, 100 µl/Napf (1 h, 37°C) <b>Pferd:</b> ab 1:1.000 in einer log2-Verdünnungsreihe; <b>Maus:</b> 1:100 bzw. 1:50; <b>Kaninchen:</b> ab 1:16.000 in einer log2-Verdünnungsreihe.	<b>Serumproben</b> (ein- bis dreifacher Ansatz) in PBS-Tween verdünnt, 100 µl/Napf (1 h, 37°C) <b>Pferd</b> ab 1:100 in einer log2-Verdünnungsreihe; <b>Maus</b> 1:100 bzw. 1:50.
<b>4. Konjugat</b>	in PBS-Tween verdünnt; 100 µl/Napf (1 h, 37°C)	
<b>5. Detektion</b>	0,03 % (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 0,5 mg/ml Orthophenylendiamin gelöst in OPD-Substratpuffer; 100 µl/Napf (30 min, 37°C)	
<b>6. Stoppen</b>	1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 µl/Napf)	

## 3.6 Tierexperimentelle Methoden

### 3.6.1 Herstellung eines Immunerums gegen rSpvD-His

Ein Kaninchen wurde viermal im Abstand von jeweils 20 Tagen s.c. dorsal der Schulterblätter mit affinitätschromatografisch aufgereinigtem rSpvD-His geimpft. Vor der ersten und jeweils 10 Tage nach der 2., der 3. und der 4. Impfung wurden Blutproben an der Ohrtrandvene genommen. Zur terminalen Blutentnahme wurde das Kaninchen nach Prämedikation mit Atropin (0,5 mg/kg KG s.c.) in Vollnarkose gelegt (25 mg/kg KG Ketamin, 5 mg/kg KG Rompun i.m.). Nach Feststellung eines hyporeflektorischen Lidreflexes bei normoreflektorischem Cornealreflex wurde das Kaninchen unter Blutentzug getötet.

### 3.6.2 Mausinfektionsmodell

Nach einer Eingewöhnungszeit an ihre neue Umgebung wurde den BALB/c-Mäuse für 6 h Futter und Wasser entzogen. Danach wurden je Gruppe drei BALB/c-Mäuse mit der in der **Tabelle 10** wiedergegebenen Keimdosis oral inokuliert. Hierzu wurden die Tiere fixiert während die Inokula mit einer Pipette in die Backentasche der Mäuse oder hinter den Incisivi platziert wurden. Die Mäuse bekamen in zwei Schritten zuerst 20 µl 10 % NaHCO<sub>3</sub> und anschließend die Keime des jeweiligen *Salmonella*-Stammes in 20 µl 1 x PBS mit 0,1 % Gelatine verabreicht. 30 min nach der Inokulation wurde den Tieren Futter und Wasser wieder *ad*

**Tabelle 10:** Gruppeneinteilung und Infektionsdosis im Mausinfektionsmodell.

Gruppen-Nr.	Anzahl der Tiere	Inokulum
0	3	1 x PBS mit 0,1 % Gelatine
1	3	<i>Salmonella</i> Dublin-Stamm 442/012, 8 x 10 <sup>6</sup> KbE
2	3	<i>Salmonella</i> Dublin-Stamm 442/012, 8 x 10 <sup>4</sup> KbE
3	3	<i>Salmonella</i> Dublin-Stamm 442/012, 7 x 10 <sup>2</sup> KbE
4	3	<i>Salmonella</i> Enteritidis-Stamm SE 147, 6 x 10 <sup>6</sup> KbE
5	3	<i>Salmonella</i> Enteritidis-Stamm SE 147, 6 x 10 <sup>4</sup> KbE
6	3	<i>Salmonella</i> Enteritidis-Stamm SE 147, 7 x 10 <sup>2</sup> KbE
7	3	<i>Salmonella</i> Typhimurium-Stamm 421/101, 9 x 10 <sup>6</sup> KbE
8	3	<i>Salmonella</i> Typhimurium-Stamm 421/101, 8 x 10 <sup>4</sup> KbE
9	3	<i>Salmonella</i> Typhimurium-Stamm 421/101, 6 x 10 <sup>2</sup> KbE

**Erläuterung:** **KbE** = koloniebildende Einheiten.

*libidum* zugeführt. Während des Versuchszeitraumes wurden die Tiere 4 bis 8 mal pro Tag adspektorisch auf das Auftreten von Salmonellose-typischen Erkrankungssymptomen, sowie die Aktivität und die Futter- und Wasseraufnahme kontrolliert. Spätestens am 21. Tag nach der Inokulation wurden die Tiere narkotisiert (600 µl Avertin/Tier i.p.) und nach Überprüfung des hyporeflektorischen Cornealreflexes unter Blutentzug getötet.

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde wie folgt bewertet (täglicher Krankheitsgrad):

**0** = ohne besonderen Befund;

**1** = geringgradige Symptomatik (leichte Apathie);

**2** = mittelgradige Symptomatik (einseitige seröse Konjunktivitis, gestäubtes Fell, Apathie);

**3** = hochgradige Symptomatik (beidseitige eitrige Konjunktivitis, gestäubtes Fell, aufgekrümmter Rücken, Absonderung von der Gruppe, verschärfte Atmung, Tier nicht mehr aktivierbar);

**4** = Tod des Tieres infolge der Salmonelleninfektion.

Zusätzlich wurden die Parameter Inkubationszeit (Zeitraum zwischen der Inokulation und dem Auftreten erster Symptome in Tagen), Dauer der Erkrankung (Zeitraum über den klinische Symptome feststellbar waren in Tagen) und Überlebensdauer der Tiere (Zeitraum ab der Inokulation bis zur Feststellung des Todes in Tagen) erfaßt. Anhand der protokollierten Symptomatik der Tiere wurden zwei Indices zur Erfassung der Schwere der Erkrankung, der "mittlere tägliche klinische Index während der Dauer der Erkrankung (mtKI)" sowie der "summierte klinische Index (sKI)", nach den Formeln

$$\text{mtKI} = \frac{\text{Summe der täglichen Krankheitsgrade während der Dauer der Erkrankung}}{\text{Dauer der Erkrankung in Tagen}}$$

und

$$\text{sKI} = \frac{\text{Summe der täglichen Krankheitsgrade ab Inokulation bis Tag 21}}{21 \text{ Tage}}$$

berechnet.

Nach dem Tod eines Tieres wurden Darm, Leber, Milz, Nieren und Lunge pathologisch-anatomisch beurteilt. Anschließend wurden Leber und Milz steril entnommen, das Organgewicht gemessen und die Keimzahl des applizierten Stammes in den Organen ermittelt (siehe **Abschnitt 3.2.3**).

## 3.7 Datenhaltung und Auswertung

### 3.7.1 Bilddokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation von experimentellen Ergebnissen wurden Elektropherogramme und Immunoblots abgebildet und die Abbildungen bildtechnisch weiterverarbeitet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Gel-Dokumentationssystem „Modell Easy Image Plus, Rev. 4.16“ (Fa. Herolab GmbH, Wiesloch). Die densitometrischen Analysen wurden an den digitalisierten Bildern (TIFF-Format) mit Hilfe des Programmes „Easy Win32“ (Version 1.00.70 15.12.96, Fa. Herolab GmbH, Wiesloch) durchgeführt.

### 3.7.2 Auswertung von DNS- und Aminosäure-Sequenzdaten

Die Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe des Software-Pakets "LASERGENE 2000<sup>®</sup>" (Fa. Dnastar Ltd., London, UK) aufgearbeitet und analysiert. Primersequenzen für die PCR und Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des Programmes "OLIGO<sup>®</sup>" Version 4.0 (Fa. MedProbe, Oslo, Norwegen) ermittelt. Alignments und Vergleiche von Nukleotidsequenzen wurden nach der ClustalW-Methode, Alignments und Vergleiche von Aminosäuresequenzen nach der Jotun-Hein-Methode durchgeführt (**121, 289**).

### 3.7.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm „SPSS for Windows“ (Version 9.0, Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Die Signifikanzschwellen sind in **Tabelle 11** aufgeführt.

**Tabelle 11:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen.

<b>Signifikanz</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Abkürzung</b>
hoch signifikant	$p \leq 0,001$	***
signifikant	$0,001 < p \leq 0,01$	**
schwach signifikant	$0,01 < p \leq 0,05$	*
nicht signifikant	$p > 0,05$	n.s.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Verbreitung und Häufigkeit des *spvD*-Gens bei *Salmonella enterica*-Isolaten

In Hinblick auf die Eignung als Antigen zur Serodiagnostik sollte untersucht werden, bei welchen *Salmonella*-Serovaren und mit welcher Häufigkeit SpvD bei *Salmonella*-Feldisolaten vorkommt. Es wurden hierzu insgesamt 874 Feldisolate, sowie 16 *Salmonella* Gallinarum-/Pullorum-Referenzstämme und Feldisolate von Kooperationspartnern mittels DNS-DNS-Hybridisierung auf das Vorhandensein des *spvD*-Gens untersucht. Als Sonden wurden die markierten PCR-Amplifikate der Primerpaare SP-3 und *spvD*-12 (Sonde "SP-3/*spvD*-12") sowie *spvD*-5 und *spvD*-6 (Sonde "*spvD*-5/-6") eingesetzt. Ergab das Dot-Blot-Verfahren kein eindeutiges Ergebnis, so wurden die Plasmide der fraglichen Stämme mit der Southern-Blot-Hybridisierung nachuntersucht. Die Stämme des Serovars Typhimurium (incl. variatio Copenhagen) wurden nicht einzeln getestet (n = 659), sondern sie wurden anhand ihres Plasmidprofils und, soweit bekannt, des Lysotyps in 144 verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe **Tabelle 13**). Je nach Anzahl der Stämme pro Gruppe wurden 1 - 29 Stämme stellvertretend untersucht (gesamt 286 Isolate). Da alle Repräsentanten eines Plasmidprofiltyps jeweils gleich reagierten, wurden die Testergebnisse auf alle 659 Isolate extrapoliert.

Insgesamt konnte *spvD* nur bei Stämmen von *S. enterica* Subspezies *enterica* nachgewiesen werden (siehe **Tabellen 12** und **15**) In der O-Gruppe B waren nur Stämme des Serovars Typhimurium (incl. variatio Copenhagen) positiv, alle anderen Serovare der O-Gruppe negativ. In der O-Gruppe D reagierten Stämme der Serovare Dublin, Enteritidis und Gallinarum/Pullorum positiv. Zwei weitere Stämme, die biochemisch zu *S. enterica* Subspezies *enterica* gehörten, aber aufgrund der unvollständigen LPS-Seitenketten (Rauh-Form) keiner O-Gruppe zuzuordnen waren, waren ebenfalls positiv. Alle Vertreter der übrigen 35 Serovare aus 16 weiteren O-Gruppen und die nicht vollständig typisierten *Salmonella*-Stämme hybridisierten mit den eingesetzten Gensonden nicht.

Bei den Serovaren Enteritidis, Dublin und Typhimurium kamen *spvD*-positive Stämme mit unterschiedlicher Häufigkeit vor. So war das *spvD*-Gen bei allen untersuchten *S. Enteritidis*- und Dublin-Stämmen (n = 32 bzw. n = 28) nachweisbar (siehe **Tabelle 12**). Bei den *S. Typhimurium*-Stämmen reagierten 87,8 % der getesteten Stämme positiv. Nach Extrapolation der Ergebnisse auf alle Typhimurium-Isolate ergab sich ein Prozentsatz von 93,5 (siehe **Tabelle 12**).

Stämme des Serovars *Salmonella* Gallinarum/Pullorum reagierten in 75 % (*spvD*-5/-6-Sonde) bzw. in 87,5 % (SP-3/*spvD*-12-Sonde) der Fälle *spvD*-positiv (siehe **Tabelle 14**). Die beiden Gallinarum-Stämme SG 9 und 9R Nobilis hybridisierten nur mit der SP-3/*spvD*-12-Sonde (siehe **Abbildung 5**).

Bei der Aufschlüsselung der Ergebnisse nach der Wirtsspezies (siehe **Tabelle 15**), von denen die *Salmonella*-Stämme isoliert worden waren, wurde deutlich, daß bei warmblütigen Spezies (n = 784) der größere Teil der Stämme *spvD*-positiv war (83,4 %). Bei Vögeln (n = 6) betrug der Anteil *spvD*-positiver Stämme 33,3 %, bei Reptilien (n = 66) 4,6 %. Bei der Betrachtung der Säuger zeigte sich, daß *Salmonella*-Stämme von Pferden (92,9 %) und Rindern (93,9 %) am häufigsten das *spvD*-Gen aufwiesen, Stämme von Fleischfressern (Hund und Katze) dagegen nur zu 58,9 % (**Tabelle 15**). Diese Unterschiede waren vor allem darauf zurückzuführen, daß das Serovarspektrum bei Pferd und Rind stärker von den virulenzplasmidhaltigen Serovaren Typhimurium, Enteritidis und Dublin (95 % der Stämme) dominiert war als das Spektrum bei Fleischfressern (69,3 %). Aber auch wenn man die Typhimurium-, Enteritidis- und Dublin-Stämme isoliert betrachtet, fällt auf, daß das Virulenzplasmid bei caninen und felines Stämmen seltener vorkam (84,8 % bzw. 87,1 %) als bei Pferde- und Rinderstämmen (96,8 % bzw. 96,2 %).

Hinsichtlich der Häufigkeit von *spvD*-positiven Stämmen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolaten gefunden werden, die aus dem Kot stammten (75,0 % *spvD*-positive Isolate) und solchen, die aus Organmaterial gewonnen worden waren (80,4 %;  $p > 0,5$ ) (siehe **Tabelle 16**). Bei den Stämmen des Serovars Typhimurium lag der Anteil *spvD*-positiver Isolate aus Kotproben und Organen bei 93 % bzw. 93,3 % ( $p > 0,5$ ). Die genauere Aufschlüsselung der Daten ergab, daß aus den typischen Besiedelungsorganen der Salmonellen (Darm, Darm-Lymphknoten, Leber und Milz) vor allem Typhimurium-, Enteritidis- und Dublin-Stämme isoliert worden waren. Stämme aus derartigen Organen waren aber nicht öfter oder seltener *spvD*-positiv als Stämme aus anderen Organen (siehe **Tabelle 17**).

**Tabelle 12:** Verteilung der *spvD*-positiven *Salmonella*-Feldstämme nach den Serovaren.

O-Gruppe	Serovar	Anzahl der Stämme		
		getestet	<i>spvD</i> -positiv	
B	Abony	1	0	0 %
	Agona	1	0	0 %
	Banana	1	0	0 %
	Brandenburg	2	0	0 %
	Derby	1	0	0 %
	Saintpaul	5	0	0 %
	Schleissheim	1	0	0 %
	Typhimurium	286	251	87,8 %
	4,12:d:-	1	0	0 %
	4,12:e,h:-	1	0	0 %
C 1	Braenderup	1	0	0 %
	Infantis	3	0	0 %
	Livingstone	4	0	0 %
	Montevideo	6	0	0 %
	Oslo	1	0	0 %
	6,7:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-	1	0	0 %
	n.t.	27	0	0 %
	C 2-3	Altona	1	0
Bovismorbificans		2	0	0 %
Charlottenburg		1	0	0 %
Ferruch		1	0	0 %
Goldcoast		1	0	0 %
Hadar		1	0	0 %
Newport		1	0	0 %
n.t.		18	0	0 %
D 1	Enteritidis	32	32	100 %
	Dublin	28	28	100 %
E	Amager	1	0	0 %
	Give	1	0	0 %
	Münster	1	0	0 %
	n.t.	8	0	0 %

Fortsetzung und Erläuterung der **Tabelle 12** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 12**

O-Gruppe	Serovar	Anzahl der Stämme		
		getestet	spvD-positiv	
F	Aberdeen	1	0	0 %
	n.t.	2	0	0 %
G	Havana	1	0	0 %
H	n.t.	1	0	0 %
I	Cardoner	1	0	0 %
J	17:g,t:e,n,x,z <sub>15</sub>	1	0	0 %
	n.t.	1	0	0 %
R	40:z <sub>4</sub> ,z <sub>24</sub> :-	1	0	0 %
T	42:z <sub>10</sub> :1,2	1	0	0 %
X	47:a:1,5	1	0	0 %
	47:k:z <sub>35</sub>	2	0	0 %
Y	48:g,z <sub>51</sub> :-	1	0	0 %
	48:r:z	2	0	0 %
	48:z <sub>4</sub> ,z <sub>23</sub> :-	1	0	0 %
Z	50:z <sub>52</sub> :z <sub>53</sub>	1	0	0 %
	50:r:z	2	0	0 %
52	52:z:z <sub>52</sub>	1	0	0 %
58	58:z <sub>52</sub> :z <sub>35</sub>	1	0	0 %
61	61:-:1,5	1	0	0 %
	61:r:1,5	1	0	0 %
	61:r:z	1	0	0 %
A-E	rauh <sup>1)</sup>	2	2	100 %
F-67	n.t.	34	0	0 %
Gesamt		501	313	62,5 %

**Erläuterung:** n.t. = nicht weiter typisiert;

1) biochemisch beides Stämme der Subspezies *enterica*, serologisch nicht weiter zu typisieren, da beide Stämme R-Form.

**Tabelle 13:** Nachweis von *spvD* bei *S. Typhimurium*-Stämmen nach Einteilung aufgrund von Plasmidprofil und Lysotyp.  
(Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung mit den Sonden *spvD*-5/-6 und SP-3/*spvD*-12).

Typ- Nr.	Plasmidprofil [Plasmidgröße in MDa]	Lysotyp	Anzahl der Stämme		
			gesamt	auf <i>spvD</i> -getestet	
				gesamt	positiv
1	kein Plasmid	DT 040	2	2	0
2	kein Plasmid	DT 008	1	1	0
3	kein Plasmid	DT 120	1	1	0
4	kein Plasmid	n.t.	9	4	0
5	2,2	DT 120	5	2	0
6	2,6/2,2/1,8/1,55	DT 177	2	2	0
7	3,1	n.t.	3	3	0
8	3,2/2,4/1,4	n.t.	1	1	0
9	3,3/2,5	n.t.	1	1	0
10	3,7	n.t.	2	2	0
11	4,1/2,1	n.t.	2	2	0
12	28	n.t.	1	1	0
13	34,4/2,8/2,0	n.t.	1	1	0
14	36	n.t.	1	1	0
15	48/2,5/1,9	DT 204c	1	1	1
16	48/6,1/2,2	n.t.	1	1	0
17	49/1,4	n.t.	1	1	1
18	52/3,4/3,0/1,5	n.t.	1	1	0
19	54/5,3/2,3/1,9	n.t.	1	1	0
20	55/2,3/1,8/1,6	RDNC	1	1	0
21	55/4,4	n.t.	9	3	3
22	57	n.t.	4	2	2
23	57/1,4	n.t.	2	2	2
24	57/2,6	n.t.	1	1	1
25	57/3,0	n.t.	1	1	1
26	58/5,3/2,3	n.t.	2	2	2
27	57/7,4/5,6/3,2/2,6/<1,4	n.t.	1	1	1
28	59/9,5	n.t.	1	1	1
29	58/31,7/5,3/2,3	n.t.	1	1	1
30	58/48/2,4	n.t.	1	1	1
31	60	DT 104	84	29	29
32	60/1,4	n.t.	7	3	3
33	60/1,45	DT 068	24	5	5
34	60/1,47	DT 104	52	10	10
35	60/2,1/1,4	n.t.	6	5	5
36	60/2,2	n.t.	10	3	3
37	60/2,2/1,5	DT 104	26	5	5
38	60/2,3/1,7/1,4	n.t.	1	1	1
39	60/2,3/2,0/1,47	DT 104	5	2	2
40	60/2,6/2,2/1,5	DT 104	83	10	10
41	60/2,8	DT 104H	11	5	5
42	60/2,8	DT 12	1	1	1
43	60/3,0	DT 104H	7	4	4
44	60/3,0/2,2	n.t.	3	2	2
45	60/3,4/2,4/1,5	n.t.	1	1	1
46	60/3,5/1,4	n.t.	1	1	1
47	60/3,6	n.t.	16	5	5
48	60/3,8/1,8/1,4	n.t.	2	2	2

Fortsetzung der **Tabelle 13** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 13**

Typ- Nr.	Plasmidprofil [Plasmidgröße in MDa]	Lysotyp	Anzahl der Stämme		
			gesamt	auf <i>spvD</i> -getestet	
				gesamt	positiv
49	60/3,8/2,1/2,0/1,8	n.t.	1	1	0
50	60/3,9/2,3	n.t.	1	1	1
51	60/3,9/2,6/2,2/1,5	DT 104	1	1	1
52	60/4,0/3,2/2,2/1,4	DT 104H	1	1	1
53	60/4,2	n.t.	1	1	1
54	60/4,5/3,2	DT 012	1	1	1
55	60/4,5/3,7/2,2/1,5	DT 104	1	1	1
56	60/4,6/2,8/1,4	n.t.	1	1	1
57	60/4,7	n.t.	7	3	3
58	60/4,7/4,1	n.t.	1	1	1
59	60/4,9/2,3/2,1/1,4	n.t.	1	1	1
60	60/5,1/4,6/2,5/2,4	n.t.	1	1	1
61	60/5,1/4,7	n.t.	1	1	1
62	60/5,2/2,8	n.t.	1	1	1
63	60/6,1	DT 104H	1	1	1
64	60/6,3/4,4/2,8/2,6/2,2/1,5	DT 104	1	1	1
65	60/6,8/3,6	n.t.	1	1	1
66	60/7,3/4,3/3,8/1,5	n.t.	2	2	2
67	60/7,4/2,2	n.t.	1	1	1
68	60/9,6/5,7/4,9/3,5	n.t.	1	1	1
69	60/11,5/3,8/1,5	n.t.	1	1	1
70	60/11,9	n.t.	1	1	1
71	60/15,4/9,8	DT 012	1	1	1
72	60/15,5/9,27/4,5	n.t.	1	1	1
73	60/24,3/11/8,2/4,4/3,7/2,1/1,4	n.t.	1	1	1
74	60/28/10,4/4,6/2,2/1,5	n.t.	1	1	1
75	60/32/2,6/2,2/1,5	n.t.	1	1	1
76	60/34/24,3/11/8,2/4,4/3,7/2,1/1,4	n.t.	1	1	1
77	60/35,4/1,8	DT 104H	1	1	1
78	60/37	n.t.	1	1	1
79	60/40/2,4	n.t.	2	2	2
80	60/43/21/2,2/1,5	DT 104	1	1	1
81	60/46/2,2/1,5	n.t.	2	2	2
82	60/55	n.t.	1	1	1
82	60/56/5,1/1,5	n.t.	1	1	1
84	64	n.t.	11	5	5
85	66/62/1,45	DT 068	9	3	3
86	67/59/34	n.t.	1	1	1
87	70	n.t.	5	2	2
88	70/35	DT 204c	2	2	2
89	70/53	n.t.	1	1	1
90	71/28/15	n.t.	1	1	1
91	72/2,3	n.t.	1	1	1
92	73/34/4,2	n.t.	1	1	1
93	73/60/34	n.t.	2	2	2
94	74	n.t.	9	3	3
95	74/35,8	n.t.	1	1	1
96	75/34	DT 204c	1	1	1
97	75/35,5/34	DT 204c	1	1	1
98	75/36/35/10	n.t.	2	2	2
99	75/60	n.t.	1	1	1

Fortsetzung der **Tabelle 13** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 13**

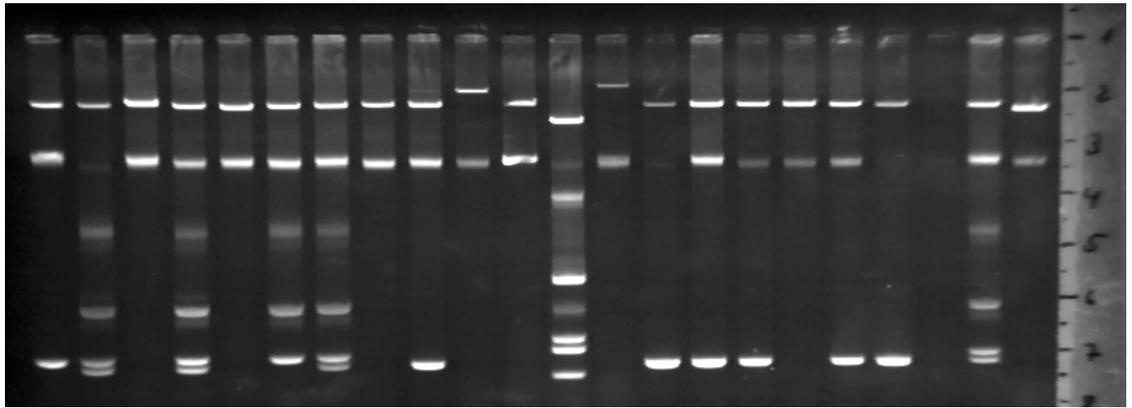
Typ- Nr.	Plasmidprofil [Plasmidgröße in MDa]	Lysotyp	Anzahl der Stämme		
			gesamt	auf <i>spvD</i> -getestet	
				gesamt	positiv
100	75/62/34	n.t.	1	1	1
101	75/70/34	n.t.	12	5	5
102	78/62	n.t.	1	1	1
103	79/70/62	n.t.	3	3	3
104	80/73/62/31,3	n.t.	1	1	1
105	80/74/35	n.t.	1	1	1
106	81/6,7/3,9	n.t.	1	1	1
107	82	n.t.	1	1	1
108	84	n.t.	1	1	1
109	84/55	n.t.	1	1	1
110	85/4,3/2,6	n.t.	1	1	1
111	85/74	n.t.	1	1	1
112	90,8/82,1	n.t.	1	1	1
113	91	n.t.	1	1	1
114	93/60/41/30/4,5/1,3	n.t.	1	1	1
115	100/62/34	DT 204c	2	2	2
116	104/62/50/35/2,9	DT 104	1	1	1
117	105/73/60/34	n.t.	3	2	2
118	105/73/71/34/4,2	n.t.	1	1	1
119	105/75/34	n.t.	1	1	1
120	108/4,4/2,4	n.t.	1	1	0
121	119/74/35	n.t.	1	1	1
122	133/62	n.t.	1	1	1
123	139	DT 120	1	1	0
124	140/66/62/1,45	DT 068	1	1	1
125	143	n.t.	1	1	0
126	144/67/62/34	DT 204c	1	1	1
127	144/73	DT 204c	1	1	1
128	144/75/34	DT 204c	5	2	2
129	144/105/73/4,1	DT 204c	5	2	2
130	144/105/75/34	DT 204c	55	11	11
131	144/105/75/59/34	DT 204c	6	3	3
132	144/105/75/59/57/34	DT 204c	1	1	1
133	144/105/75/60/34/2,6/2,2	n.t.	1	1	1
134	144/105/75/62/34/32,5	DT 204c	1	1	1
135	144/105/75/65/34	n.t.	16	6	6
136	144/105/75/70/34	n.t.	11	4	4
137	144/105/75/73/34/4,1	n.t.	1	1	1
138	144/105/80/68/36/34	n.t.	1	1	1
139	144/105/80/75/34	n.t.	1	1	1
140	144/105/82/75/57/34/20	n.t.	1	1	1
141	144/110/105/75/34	DT 204c	7	3	3
142	144/119/75/34	n.t.	3	2	2
143	147	n.t.	1	1	0
144	166	n.t.	2	2	0
<b>Gesamt</b>			<b>659</b>	<b>286</b>	<b>251</b>

**Erläuterung:** n.t. = nicht getestet.

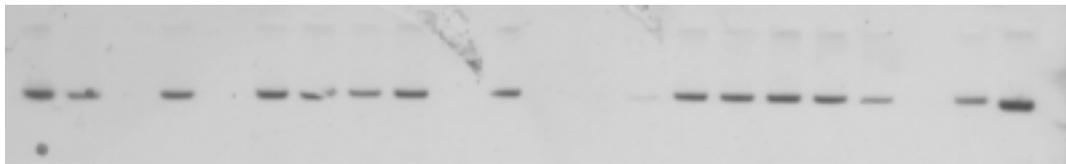
**Tabelle 14:** Nachweis des *spvD*-Gens bei *Salmonella* Gallinarum/Pullorum-Referenzstämmen und Feldisolaten von Kooperationspartnern.  
(Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung mit den Sonden *spvD*-5/-6 und SP-3/*spvD*-12)

Biovar	Stamm	Plasmidprofil [Größe in MDa]	Molekulare Masse der hybridisierenden Plasmide in MDa	
			Sonde SP-3/ <i>spvD</i> -12	Sonde <i>spvD</i> -5/-6
Gallinarum	1714/93	57	57	57
	1909/93	57/2,8/1,9	57	57
	1910/93	57/2,8/1,9/1,7	57	57
	21-92	57	57	57
	287/91	57/1,7	57	57
	5441	57/1,7	57	57
	72/805	57/1,7	57	57
	9R Nobilis	57/1,7	57	-
	SG 9	57/1,7	57	-
	Ti 184/64	57/1,7	57	57
	x-170/98	kein Plasmid	-	-
	x-250/99	57/2,8/1,9/1,7	57	57
	Pullorum	ATCC 19945	57/1,9	57
VA 1197/89		57/2,8/1,9/1,7	57	57
x-200-k/98		57/2,8/1,9/1,7	57	57
x-201/98		57	-	-

**A:** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



**B1:** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



**B2:** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



**Abbildung 5:** Nachweis des *spv*-Locus auf den Plasmiden von *Salmonella* Gallinarum-/Pullorum-Stämmen mittels DNS-DNS-Hybridisierung.

**A:** Elektropherogramm (0,8 %-iges Agarosegel) mit aufgereinigten Plasmiden

**B:** Autoluminogramm des Southern-Blots von **A**. Hybridisierung mit der SP3-/*spvD*-12-Sonde (**B1**), bzw. *spvD*-5/-6-Sonde (**B2**).

**Spur 1:** ATCC 19945;                    **2:** VA 1197/89;                    **3:** x-200-g/98;  
**4:** x-200-k/98;                    **5:** x-201/98;                    **6:** 1909/93;  
**7:** 1910/93;                    **8:** 1714/94;                    **9:** 5441;  
**10:** R27;                    **11:** x-109/97 und STm;                    **12:** V517;  
**13:** R478;                    **14:** SG 9;                    **15:** 9R Nobilis;  
**16:** 287/91;                    **17:** 21-92;                    **18:** 72/805;  
**19:** Ti 184/64;                    **20:** x-170/98;                    **21:** x-250/99;  
**22:** *Salmonella* Dublin LANE.

**Tabelle 15:** Nachweis des *spvD*-Gens bei *Salmonella*-Feldstämmen nach dem Wirt.

Serovar	Anzahl der Stämme					
	(Anzahl der <i>spvD</i> -positiven / Anzahl aller Stämme der Gruppe)					
	Pferd	Rind	Hund/ Katze	andere Säuger <sup>1)</sup>	Reptilien	Vögel
Typhimurium	265/274 (96,7 %)	202/211 (95,7 %)	82/99 (82,8 %)	45/53 (84,9 %)	2/2 (100 %)	1/1 (100 %)
Enteritidis	10/10 (100 %)	4/4 (100 %)	8/8 (100 %)	9/9 (100 %)	0	1/1 (100 %)
Dublin	0	22/22 (100 %)	5/5 (100 %)	0	1/1 (100 %)	0
andere Serovare	0/12 (0 %)	1/7 <sup>2)</sup> (14,29 %)	1/50 <sup>2)</sup> (2 %)	0/19 (0 %)	0/63 (0 %)	0/4 (0 %)
Gesamt	275/296 (92,9 %)	229/244 (93,9 %)	96/163 (58,9 %)	54/81 (66,7 %)	3/66 (4,6 %)	2/6 (33,3 %)

**Erläuterung:** n.t. = nicht weiter typisiert;

- 1) Elefant, Igel, Känguruh, Kaninchen, Maus, Meerschweinchen, Mensch, Schaf, Schleichkatze, Schwein, Seehund, Wasserschwein, Ziege;
- 2) *spvD*-positiver Stamm von *Salmonella* Subspezies *enterica*, R-Form.

**Tabelle 16:** Häufigkeit der *spvD*-positiven Salmonellen-Stämme nach der Art des Probenmaterials, aus dem die Stämme isoliert wurden.

Serovar	Anzahl der Stämme				
	(Anzahl der <i>spvD</i> -positiven / Anzahl aller Stämme der Gruppe)				
	Kot	Organmaterial	Umgebung Futter	Lebensmittel	k.A.
Typhimurium	409/440 (93 %)	167/179 (93,3 %)	18/18 (100 %)	14/15 (93,3 %)	6/6 (100 %)
Enteritidis	20/20 (100 %)	12/12 (100 %)	0	0	0
Dublin	19/19 (100 %)	9/9 (100 %)	0	0	0
andere Serovare	1/120 (0,8 %)	1/35 (2,9 %)	0	0	0
Gesamt	449/599 <sup>1)</sup> (75 %)	189/235 <sup>1)</sup> (80,4 %)	18/18 (100 %)	14/15 (93,3 %)	6/6 (100 %)

**Erläuterung:** k.A. = keine Angabe;

1) *spvD*-positiver Stamm von *Salmonella* Subspezies *enterica*, R-Form.

**Tabelle 17:** Häufigkeit der *spvD*-positiven Salmonellen-Stämme nach dem Organ, aus dem die Stämme isoliert worden waren.

Serovar	Anzahl der Stämme (Anzahl der <i>spvD</i> -positiven / Anzahl aller Stämme der Gruppe)							
	Leber	Milz	Darm	Darm-Lnn	Niere	Lunge	Haut	andere <sup>1)</sup>
Typhimurium	28/31 (90,3 %)	24/24 (100 %)	70/76 (92,1 %)	8/8 (100 %)	3/3 (100 %)	9/11 (82 %)	2/2 (100 %)	23/24 (95,8 %)
Enteritidis	3/3 (100 %)	3/3 (100 %)	1/1 (100 %)	0	1/1 (100 %)	2/2 (100 %)	0	2/2 (100 %)
Dublin	1/1 (100 %)	1/1 (100 %)	1/1 (100 %)	0	0	2/2 (100 %)	1/1 (100 %)	3/3 (100 %)
andere Serovare	0/3 (0 %)	0/2 (0 %)	0/6 (0 %)	0/1 (0 %)	0	0/3 (0 %)	0/6 (0 %)	1/14 <sup>2)</sup> (7,1 %)
Gesamt	32/38 (84,2 %)	28/30 (93,3 %)	72/84 (85,7 %)	8/9 (88,9 %)	4/4 (100 %)	13/18 (72,2 %)	3/9 (33 %)	29/43 (67,4 %)

**Erläuterung:** Lnn = Lymphknoten;

- 1) Abortmaterial, Blase, Blut, Cervix tupfer, Fistel tupfer, Gelenk tupfer, Magen, Mamma, Muskel, Nase, Netz, Thorax, Thymus, Uterus;
- 2) *spvD*-positiver Stamm von *Salmonella* Subspezies *enterica*, R-Form.

## 4.2 Variabilität der Primärstruktur des SpvD

### 4.2.1 Nukleotidsequenzen des *spvD*-Gens bei *Salmonella enterica*-Stämmen verschiedener Serovare und Herkunft

Um die Veränderung des *spvD*-Gens in der Phylogenese der Salmonellen zu untersuchen, wurden entsprechende DNS-Abschnitte von 17 *Salmonella*-Stämmen der Serovare Abortusequi, Dublin, Enteritidis, Gallinarum/Pullorum und Typhimurium sequenziert. Bei der Auswahl der Stämme wurde darauf geachtet, daß diese sich in Antigenität, Plasmidprofil, Phagentyp, Wirtsspezies, geographischer Herkunft, sowie dem Jahr der Isolierung möglichst stark unterschieden (siehe **Tabelle 18**). Durch eine PCR mit den Primern *spvC*-9 und *orfE*-2 wurde jeweils ein das gesamte *spvD*-Gen umgreifender DNS-Abschnitt amplifiziert und anschließend doppelsträngig sequenziert. Die so erhaltenen 17 Nukleotidsequenzen sind unter den Einträgen AF329248 bis AF329263, sowie AY038080 in der GenBank abrufbar.

Das *spvD*-Strukturgen erwies sich bei den untersuchten *Salmonella enterica*-Stämmen als hoch homolog (98,8 bis 100 % Identität). In der Nukleotidsequenz konnten insgesamt 15 polymorphe Stellen in 15 verschiedenen Codons gefunden werden (siehe **Tabelle 19**). Dadurch konnten neun verschiedene Allele differenziert werden, welche sich in ein bis sechs Nukleotiden unterschieden. Eine Ausnahme bildete der *S. Gallinarum*-Stamm Ti 184/64, der von den übrigen Allelen in sechs bis neun Nukleotiden abwich. Fast alle Stämme der Serovare Dublin und Typhimurium stimmten untereinander sowie mit den bereits von anderen Autoren veröffentlichten Sequenzen der Stämme Lane und SR-11 zu 100 % überein (GenBank-Einträge X56727 und Z11561). Eine Sequenzvariation in Form einer einzigen Nukleotidsubstitution (Codon 183) war nur bei dem *S. Typhimurium*-Stamm 5304/98 vorhanden. Die höchste Variabilität trat bei den Serovaren Gallinarum (drei Allele bei drei sequenzierten Stämmen) und Enteritidis (zwei Allele bei drei sequenzierten Stämmen) auf. Besonders der Gallinarum-Stamm Ti 184/64 mit insgesamt sechs Mutationen im *spvD*-Gen war hier auffällig. Dieser Stamm erzielte beim paarweisen Vergleich der Sequenzen nach Jotun-Hein den niedrigsten Ähnlichkeitswert (98,8 % Ähnlichkeit mit *spvD* von *S. Abortusequi* Stamm L-2508).

Auf der Ebene der SpvD-Aminosäuresequenz konnten acht Varianten differenziert werden (siehe **Tabelle 20**). Bei Vernachlässigung des Stammes Ti 184/64, wurden Aminosäuresubstitutionen an elf Positionen des insgesamt 216 Aminosäuren umfassenden Peptids nachgewiesen. Im paarweisen Vergleich unterschieden sich die einzelnen Varianten in nicht mehr als vier Aminosäuren voneinander (97,7 bis 100 % Identität). Die Nukleotidsubstitution im

Codon 183 des *S. Typhimurium*-Stammes 5304/98 erwies sich als eine Wobbelmutante, die zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz führte. Somit kodierten alle getesteten Stämme der Serovare *S. Dublin* und *S. Typhimurium* für die gleiche Aminosäuresequenz von SpvD. Bei den *S. Enteritidis*-Stämmen bewirkte jede Nukleotidsubstitution eine Änderung der Aminosäuresequenz und führte so zur Bildung von zwei weiteren SpvD-Varianten. Diese beiden Varianten besaßen je eine Substitution (Ala-154 zu Val-154, bzw. Phe-200 zu Leu-200), die sie von den *S. Typhimurium*- und *S. Dublin*-Stämmen unterschied. Eine weitere Abweichung der *S. Enteritidis*-Varianten von der *S. Typhimurium*-/*S. Dublin*-Variante betraf die Aminosäure Glycin an Position 161, die durch Arginin ersetzt war. Diese Abweichung trat aber nicht nur bei den *S. Enteritidis*-Stämmen auf, sondern auch bei dem untersuchten *S. Abortusequi*-Stamm L-2508. Dieser Stamm besaß aber zusätzlich eine Substitution von Glu-150 zu Asp-150, wodurch eine vierte SpvD-Variante definiert wurde. Auch bei Stämmen des Serovars *Gallinarum*/*Pullorum* waren serovarspezifische Charakteristika in der SpvD-Aminosäuresequenz vorhanden. So besaßen sie alle an Position 67 Valin anstelle von Iso-leucin. Beim SpvD von *S. Gallinarum*-Stamm 72/805 war das Glutamin an Position 48 außerdem durch Lysin ersetzt (SpvD-Variante 6). Die Stämme 1910/93 und VA 1197/89 produzierten eine weitere SpvD-Variante, bei der Asparaginsäure an Position 11 durch Asparagin ersetzt war. Die veröffentlichte Nukleotidsequenz des *S. Choleraesuis*-Stammes RF-1 kodierte für eine weitere SpvD-Variante, die sich von der *S. Typhimurium*-/*S. Dublin*-Variante an zwei Positionen in charakteristischer Weise unterschied (Glu-28 anstelle von Asp-28, sowie Asp-127 anstelle von Glu-127). Die SpvD-Variante 7 wurde bei dem *S. Gallinarum*-Stamm Ti 184/64 identifiziert. Diese Variante unterschied sich von allen anderen Varianten am stärksten. Im Vergleich zur SpvD-Variante der *S. Typhimurium*-/*S. Dublin*-Stämme waren Asp-11 zu Asn-11, Arg-52 zu Leu-52 und Val-67 zu Ile-67 substituiert. Außerdem war die Nukleotidsequenz im *spvD*-Gen dieses Stammes der Code so verändert, daß an Position 73 der Code für ein Stoppsignal (*opa*) an die Stelle des Triplets für die Aminosäure Cystein trat. Dieser Stamm kodierte daher nur für ein SpvD-Rudiment aus den 72 N-terminalen Aminosäuren.

**Tabelle 18:** Übersicht über die zur Sequenzanalyse des *spvD*-Gens verwendeten *Salmonella*-Stämme.

Stamm	Serovar	Phagentyp	Plasmide <sup>1)</sup> [MM in MDa]	Wirtspezies	Jahr u. Ort der Isolierung
L-2508	Abortusequi	n.t.	<u>60</u>	Pferd	1987, Hokaido, Japan
P 100/93	Dublin	n.t.	<u>51</u>	Rind	1993, Grünberg
P 108/93	Dublin	n.t.	<u>47</u>	Rind	1993, Grünberg
x-7/93	Dublin	n.t.	<u>51</u>	k.A.	1993, Meiningen
x-249/99	Dublin	n.t.	<u>51/32</u>	k.A.	k.A.
2501/98	Enteritidis	PT 4	<u>40</u>	Pferd	1998, Gießen
491/93	Enteritidis	PT 8/7	<u>40</u>	Pferd	1993, Gießen
2713/98	Enteritidis	PT 11b	<u>55</u>	Igel	1998, Gießen
72/805	Gallinarum	n.t.	<u>57/1,7</u>	k.A.	k.A.
Ti 184/64	Gallinarum	n.t.	<u>57/1,5</u>	k.A.	k.A.
1910/93	Gallinarum	n.t.	<u>57/2,5/1,7/1,6</u>	Huhn	1993, Potsdam-Bornstedt
VA 1197/89	Pullorum	n.t.	<u>57/2,8/1,9/1,7</u>	Huhn	k.A.
x-115/97	Typhimurium	DT 68	66/ <u>60</u> /1,45	Rind	1997, Kirtorf
5304/98	Typhimurium	DT 104H	<u>60</u> /2,9	Rind	1998, Gießen
6785/92	Typhimurium var. Cop.	DT 204c	<u>75/36/35/10</u>	Pferd	1992, Gießen
5972/93	Typhimurium var. Cop.	DT 204c	144/105/ <u>75</u> /59/57/34	Pferd	1993, Gießen
x-148/98	Typhimurium var. Cop.	DT 2	<u>60</u>	Taube	k.A.

**Erläuterung:** k.A. = keine Angabe; MM = Molekulare Masse; n.t. = nicht typisiert; var. Cop. = variatio Copenhagen (O5<sup>-</sup>-Variante).

1) die *spv*-tragenden Plasmide sind unterstrichen

**Tabelle 19:** Vergleich der Nukleotidsequenzen der *spvD*-Gene von 20 verschiedenen *Salmonella*-Stämmen (einschließlich der bereits in der GenBank veröffentlichten Sequenzen X56727, Z11561 und AB040415).

Stamm	Serovar	Codon															Allel Nr.
		11	17	28	48	52	67	73	127	143	150	154	161	183	194	200	
<b>LANE</b> <sup>1)</sup>	Dublin	GAT	AAT	GAA	CAA	CGA	GTC	TGC	GAT	AGT	GAG	GCT	AGA	TCT	CAA	TTC	1
<b>P 108/93</b>	Dublin	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>P 100/93</b>	Dublin	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>x-7/93</b>	Dublin	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>x-249/99</b>	Dublin	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>SR-11</b> <sup>2)</sup>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>x-115/97</b>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>6785/92</b>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>5972/93</b>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>x-148/98</b>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1
<b>5304/98</b>	Typhimurium	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..C	...	...	2
<b>2501/98</b>	Enteritidis	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	G..	...	...	...	...	3
<b>491/93</b>	Enteritidis	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	G..	...	...	...	...	3
<b>2713/98</b>	Enteritidis	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	C..	...	4
<b>L-2508</b>	Abortusequi	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	G..	...	..G	...	...	5
<b>RF-1</b> <sup>3)</sup>	Choleraesuis	...	...	..T	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	6
<b>72/805</b>	Gallinarum	...	...	...	A..	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	7
<b>Ti 184/64</b>	Gallinarum	A..	..C	...	...	..T	A..	..A	...	...	..T	...	...	...	...	...	8
<b>1910/93</b>	Gallinarum	A..	...	...	...	...	A..	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	9
<b>VA 1197/89</b>	Pullorum	A..	...	...	...	...	A..	...	..C	...	...	...	...	...	...	...	9

**Erläuterung:** . = Übereinstimmung zu X56727. Die Nummerierung der Codons beginnt am *spvD*-Startcodon mit 1.  
**1)** GenBank-Eintrag: X56727; **2)** GenBank-Eintrag: Z11561; **3)** GenBank-Eintrag: AB040415.

**Tabelle 20:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des SpvD-Proteins von 20 verschiedenen *Salmonella*-Stämmen (einschließlich der bereits in der GenBank veröffentlichten Sequenzen X56727, Z11561 und AB040415).

Stamm	Serovar	Aminosäure-Position															Variante Nr.
		11	17	28	48	52	67	73	127	143	150	154	161	183	194	200	
<b>LANE</b> <sup>1)</sup>	Dublin	<b>Asp</b>	<b>Asn</b>	<b>Glu</b>	<b>Gln</b>	<b>Arg</b>	<b>Val</b>	<b>Cys</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Ser</b>	<b>Gln</b>	<b>Phe</b>	1
<b>P 108/93</b>	Dublin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>P 100/93</b>	Dublin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>x-7/93</b>	Dublin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>x-249/99</b>	Dublin	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>SR-11</b> <sup>2)</sup>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>x-115/97</b>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>6785/92</b>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>5972/93</b>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>x-148/98</b>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>5304/98</b>	Typhimurium	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
<b>2501/98</b>	Enteritidis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Val</b>	<b>Gly</b>	.	.	.	2
<b>491/93</b>	Enteritidis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Val</b>	<b>Gly</b>	.	.	.	2
<b>2713/98</b>	Enteritidis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Gly</b>	.	.	<b>Leu</b>	3
<b>L-2508</b>	Abortusequi	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<b>Asp</b>	.	<b>Gly</b>	.	.	.	4
<b>RF-1</b> <sup>3)</sup>	Choleraesuis	.	.	<b>Asp</b>	.	.	.	.	<b>Glu</b>	.	.	.	.	.	.	.	5
<b>72/805</b>	Gallinarum	.	.	.	<b>Lys</b>	.	<b>Ile</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6
<b>Ti 184/64</b>	Gallinarum	<b>Asn</b>	.	.	.	<b>Leu</b>	<b>Ile</b>	<b>stop</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	7
<b>1910/93</b>	Gallinarum	<b>Asn</b>	.	.	.	.	<b>Ile</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8
<b>VA 1197/89</b>	Pullorum	<b>Asn</b>	.	.	.	.	<b>Ile</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8

**Erläuterung:** . = Übereinstimmung zu X56727.

**1)** GenBank-Eintrag: X56727; **2)** GenBank-Eintrag: Z11561; **3)** GenBank-Eintrag: AB040415.

## 4.3 Rekombinante Herstellung des SpvD

### 4.3.1 Klonierung des *spvD*-Gens in *E.coli* K12

Da eine Reindarstellung von SpvD direkt aus der Kultur eines *Salmonella*-Stammes nicht möglich war, wurde versucht, das *spvD*-Gen in *E.coli* K12 zu überexprimieren. Die Klonierungsstrategie sah vor, den *spvD*-kodierenden DNS-Abschnitt des *S. Typhimurium*-Stammes ATCC 19585 mittels PCR zu amplifizieren und anschließend in einen geeigneten Plasmidvektor, den Vektor pET-24b(+), zu ligieren. Bei der Ligation war darauf zu achten, das *spvD*-Gen mit den DNS-Sequenzen des Expressionssystems derart zu kombinieren, daß das *spvD*-Genprodukt carboxyterminal mit einem kurzen Peptid inklusive einem Oligo-Histidin-Marker versehen war, um die spätere Aufreinigung zu erleichtern. Die Primer *spvD*-3 und *spvD*-4 sollten den Anfang und das Ende des Gens modifizieren: vor dem Startcodon sollte eine *NdeI*-Schnittstelle eingefügt werden und das Stopcodon durch Einfügen einer *EcoRI*-Schnittstelle zerstört werden, um mit einer gerichteten "sticky-end"-Ligation die gewünschte Orientierung des Inserts sicherzustellen. Erfolgreich transformierte *E.coli* K12 BLR(DE3)-Zellen sollten im ersten Selektionsschritt anhand der Kanamycin/Tetrazyklin-Resistenz erkannt und anhand ihrer Plasmidprofile, Restriktionsmuster (Enzyme *NdeI* und *EcoRI*) sowie ihrer Ergebnisse in der pET-A/pET-B-PCR, der *spvD*-5/*spvD*-6-PCR und der Sequenzierung (Strang und Gegenstrang) weiter selektiert werden.

Die Ligations- und Transformationsversuche führten im dritten Anlauf zur Isolierung von *E.coli*-Klonen, die aufgrund der Testresultate ein rekombinantes Plasmid mit dem modifizierten *spvD*-Gen aufwiesen. Die Sequenzierung bestätigte, daß der Leserahmen des *spvD*-Gens wie vorgesehen um 69 Nukleinsäuren verlängert war. Das Plasmid erhielt die institutsinterne Bezeichnung pHIT-IV-2. Der *spvD*-Abschnitt stimmte vollständig mit den von **KRAUSE ET AL.** und **GULIG ET AL.** veröffentlichten Sequenzen von *spvD*-Genen überein (GenBank-Einträge X56727 bzw. Z11561). Die Nukleotidsequenz des modifizierten *spvD*-Gens ist in der **Abbildung 6** wiedergegeben.

Das auf diese Weise hergestellte Genkonstrukt kodierte für ein Peptid aus 235 Aminosäuren mit der Bezeichnung "rSpvD-His". Alle 215 Aminosäuren aus dem SpvD sowie 14 Aminosäuren des Linkerpeptids und der aus sechs Histidinmolekülen bestehende Marker waren in dem Peptid enthalten. Die Aminosäuresequenz von rSpvD-His ist der **Abbildung 7** zu entnehmen.

```

atgagagtttctggtagtgcgatcccaagatataatatcacgtataaattcaaaaaatatcaataata 70
atgattcaaatgaagtcaagagaattaaagatgcgctttgtattgaatcaaaagagagaatTTTGTATCC 140
acaaaatttgagtcgagataatTTTAAACAAATGGCTAGATATGTAATAATACATACGTCCATTACTCT 210
gggaactgcgTTTTATTATCAGCGTGTTCATTATAACATACATCACCGACAGGATATATTAAGTTCGA 280
agaacactgcctctcctacagtgggattagacagcgccattgTTGATAAAATCATTTTTGGTCATGAGCT 350
taaccaatcatattgTTTAAATCCATCGATGAGGTGGAAAAAGAAATATTA AACCGTTATGACATTAAG 420
agggaaagttctTTTATCATTAGCGCAGAGAACTACATAGCTCCAATAATTGGCGAATGTAGACATGATT 490
tcaacgctgtggttatctgtgaatatgataaaaaaccatagtacaattcattgattcttggaaaacatc 560
caacatacttcttagcttacaagaaataaaaaaacacttctcatcatcaggggaatTTTATGTcagggct 630
tatgatgaaaaacagattcgaattcgagctccgctcgacaagcttgcggccgcactcgagCACCACCACC 700
ACCACCACtga 711

```

**Abbildung 6:** Nukleotidsequenz des modifizierten *spvD*-Gens.

Die unterstrichene Sequenz kodiert für das Linkerpeptid, das das *spvD*-Genprodukt mit dem Histidin-Marker (kodierende Sequenz in Großbuchstaben) verbindet. Das Stopcodon ist kursiv dargestellt.

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
MRVSGSASSQDIISRINSKNINNNDSNEVKRIKDALCIESKERILYPQNL SRDNLKQMAR
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
YVNNTYVHYSGNCVLLSACLHYNIHHRQDILSSKNTASPTVGLDSAIVDKIIFGHELNQS
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
YCLNSIDEVEKEILNRYDIKRESSFIISAENYIAPIIGECRHFNAVVICEYDKKPYVQF
      190     200     210     220     230
      |      |      |      |      |
IDSWKTSNILPSLQEIKKHFSSSGEFYVRAYDEKHDSSNSSSVDKLAAALEHHHHHH

```

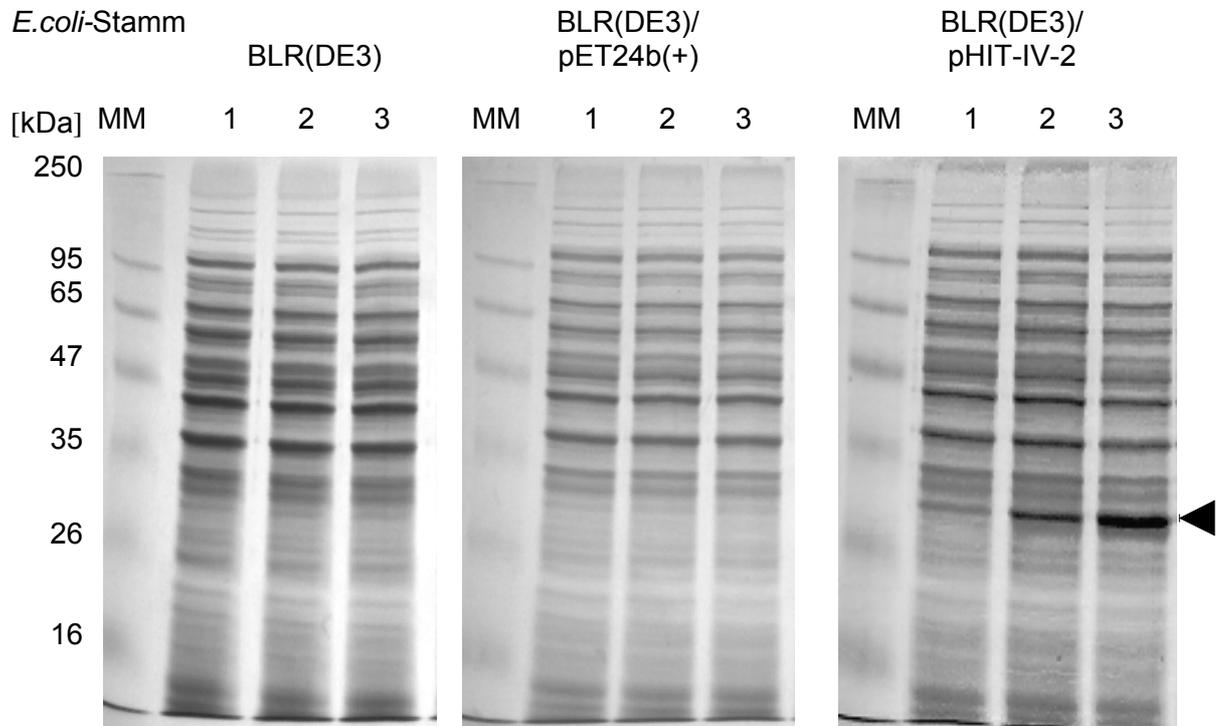
**Abbildung 7:** Aminosäuresequenz von rSpvD-His.

Die unterstrichene Sequenz ist die Linkersequenz, welche den Übergang zum Histidin-Marker darstellt.

### 4.3.2 Nachweis und Optimierung der Überexpression des rekombinanten SpvD als Histidin-markiertes Fusionsprotein

Um zu prüfen, ob die mit dem Plasmid pHIT-IV-2 transformierten *E.coli*-Bakterien das SpvD-Fusionsprotein auch exprimierten, wurden die Zellen unter Kanamycin/Tetrazyklin-Selektionsdruck angezüchtet, mit IPTG stimuliert und anschließend lysiert. Die Proteinprofile dieser Lysate wurden dann mittels SDS-PAGE und Westernblot-Verfahren analysiert. In dem Keimlysate des IPTG-stimulierten *E.coli*-Klons BLR(DE3)/pHIT-IV-2 war ein dominantes Protein sichtbar, dessen molekulare Masse (ca. 27 kDa) nahezu exakt mit der für das rSpvD-His vorausgerechneten Masse von 27040 Da übereinstimmte (**Abbildung 8**). Im Immunoblotverfahren war einzig dieses Produkt in der Lage, das Ni<sup>2+</sup>-NTA-Peroxidasekonjugat zu binden, und es wurde daher als das rekombinante SpvD-Fusionsprotein angesehen (**Abbildung 9**). Das rSpvD-His war in den Keimlysaten des Klons auch dann nachweisbar, wenn keine Stimulation mit IPTG stattgefunden hatte. Allerdings war die Menge erheblich geringer (**Abbildung 8**). Ein entsprechendes Produkt war jedoch niemals in den Keimlysaten von plasmidlosen BLR(DE3)-Zellen oder in BLR(DE3)-Zellen nachzuweisen, die das leere Klonierungsplasmid pET24b(+) enthielten.

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob das rSpvD-His in den Keimlysaten als wasserlösliches Protein vorlag oder in Form unlöslicher Einschlusskörper. Hierzu wurden Keime von *E.coli* BLR(DE3)/pHIT-IV-2 in Kanamycin/Tetracyclin-haltigem Medium unter IPTG-Stimulation angezüchtet, mittels Ultraschall lysiert und zentrifugiert. Die Bestandteile des Überstandes und des resuspendierten Pellets wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue sichtbar gemacht. Die gefärbten Elektropherogramme wurden densitometrisch ausgewertet, um die Verteilung des 27 kDa-Produktes in der löslichen (Überstand) und unlöslichen (Pellet) Phase semiquantitativ zu bestimmen. Ein repräsentatives Elektropherogramm aus dieser Versuchsreihe ist in **Abbildung 10** wiedergegeben. Die densitometrische Auswertung ergab, daß der überwiegende Teil von rSpvD-His (ca. 60 %) nach Anzucht bei 30°C in der löslichen Fraktion vorlag. Das rekombinante Protein machte dabei insgesamt ca. 25 % aller löslichen, mit Coomassie-Brilliant-Blau anfärbbaren Bestandteile aus.

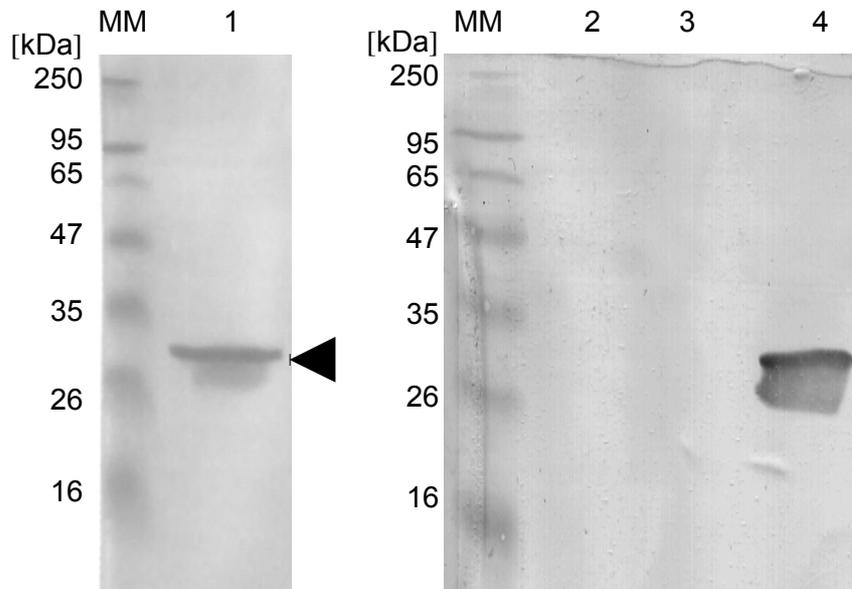


**Abbildung 8:** Bakterienzellproteinprofile von *E. coli*-K12-Stämmen nach Anzucht in Ab- und Anwesenheit von IPTG.  
(12,5 %-iges SDS-PAGE nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung)

- 1: 0  $\mu$ M IPTG,  
2: 3,9  $\mu$ M IPTG,  
3: 15,6  $\mu$ M IPTG.

◀ = rSpvD-His,

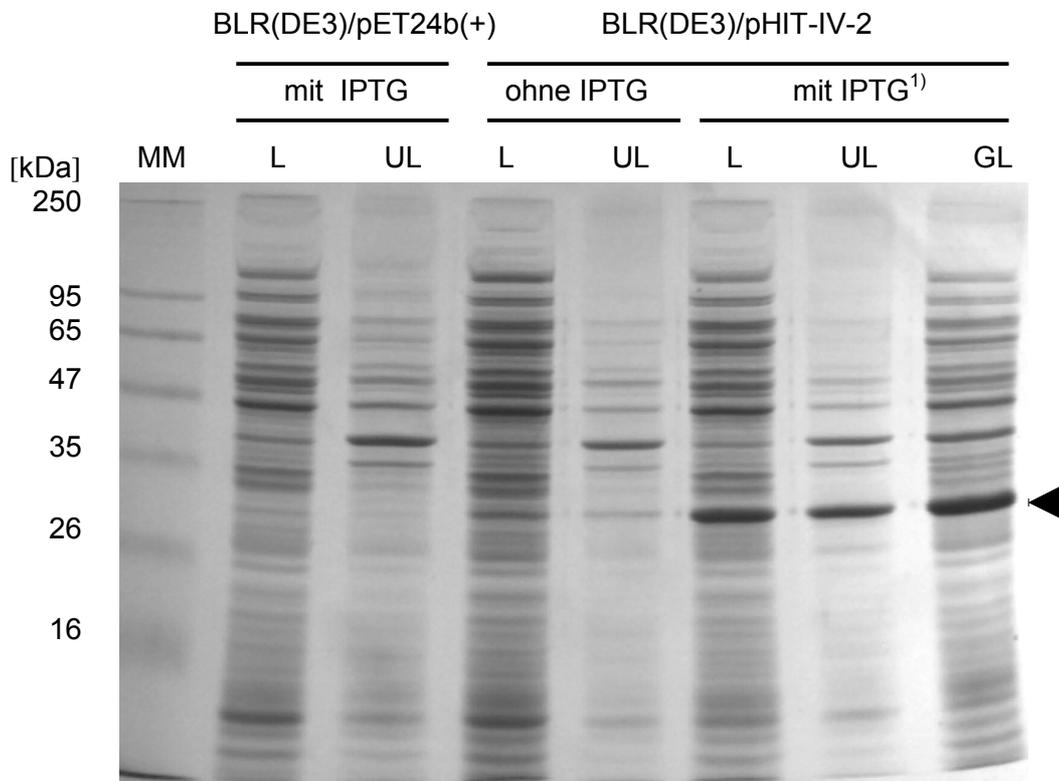
MM = Molekularmassenmarker SeeBlue.



**Abbildung 9:** Nachweis des rSpvD-His aus dem *E.coli*-K12-Stamm im Westernblot unter Verwendung von  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Peroxidase-Konjugat.  
(Westernblot, Bakterienzellysate nach Anzucht der Bakterien in Anwesenheit von 1 M IPTG)

- 1: BLR(DE3)/pHIT-IV-2
- 2: BLR(DE3)/pET24b(+)
- 3: BLR(DE3)
- 4: RU244

◄ = rSpvD-His,  
MM = Molekularmassenmarker SeeBlue.



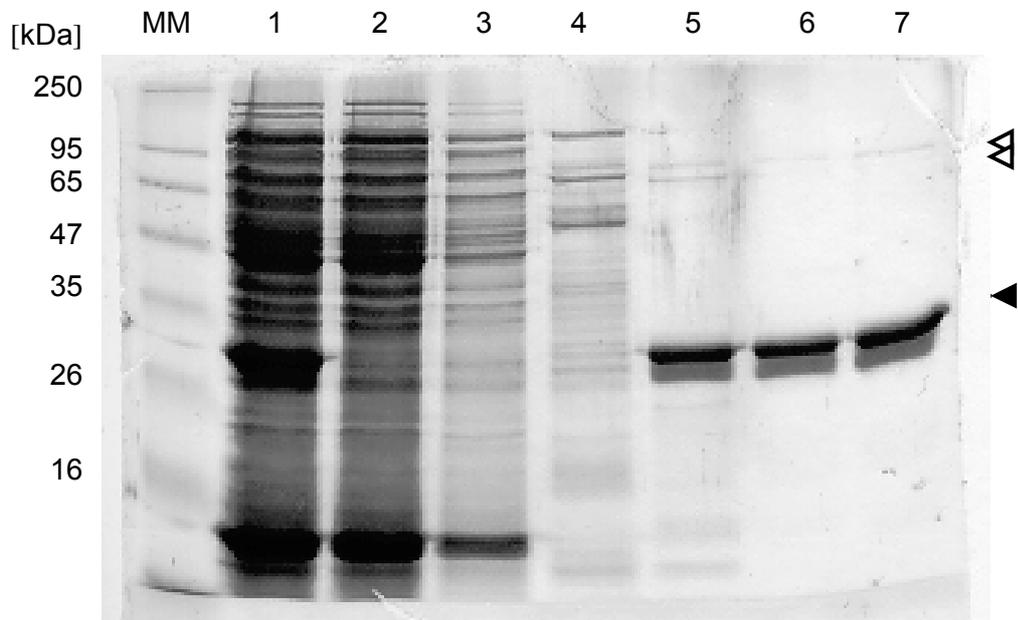
**Abbildung 10:** Proteinprofile von *E.coli*-K12-Stämmen.  
 (lösliche und unlösliche Fraktionen der Zellysate; 12,5 %-iges SDS-PA-Gel  
 nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung)  
 Die Beladung jeder Spur entspricht den Bestandteilen von ca.  $6 \times 10^6$  KbE.

- 1) IPTG-Konzentration = 15  $\mu$ M.  
**L** = lösliche Fraktion des Bakterienzellysates;  
**UL** = unlösliche Fraktion des Bakterienzellysates;  
**GL** = Bakterienzellysat;  
**MM** = Molekularmassenmarker SeeBlue;  
 ◀ = rSpvD-His.

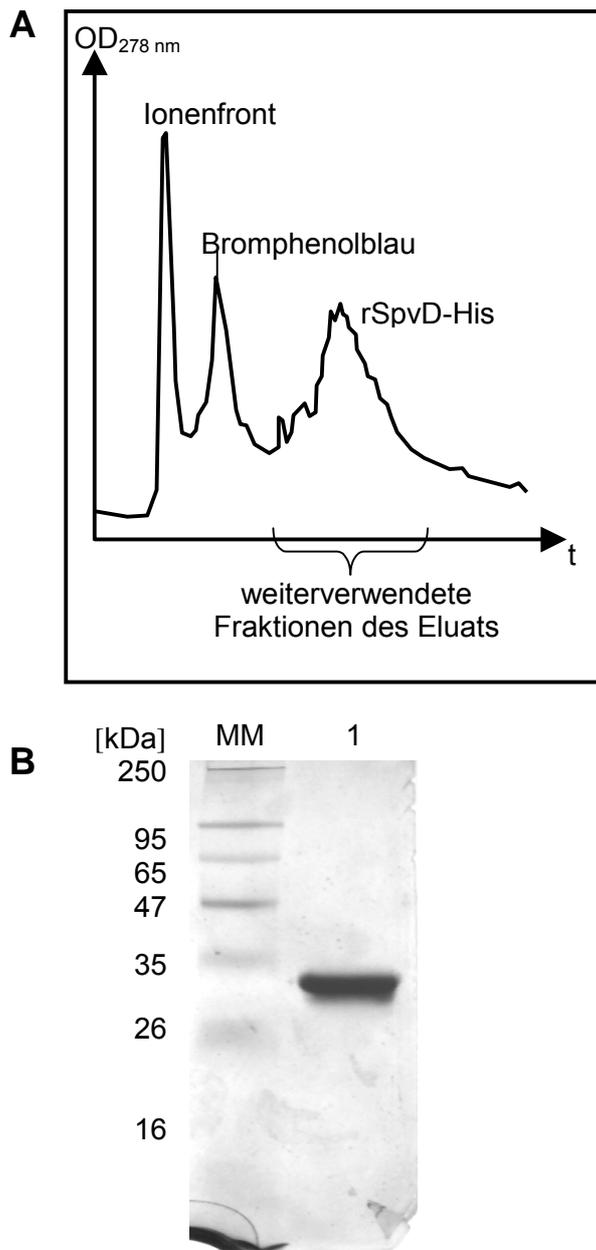
### 4.3.3 Isolierung und Reindarstellung des rSpvD-His

Im nächsten Schritt wurde versucht, das rSpvD-His anhand seines Histidin-Markers säulenchromatographisch aus Keimlysaten von *E.coli* BLR(DE3)/pHIT-IV-2 zu isolieren und an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix aufzureinigen. Um den Verlauf der Aufreinigung zu verfolgen wurden das Ausgangsmaterial und die verschiedenen Zwischenprodukte mittels SDS-PAGE kontrolliert. In **Abbildung 11** ist das Ergebnis eines derartigen Aufreinigungsdurchganges exemplarisch wiedergegeben.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte das rSpvD-His nahezu vollständig aus dem Keimlysat isoliert und an die Säule gebunden werden. Das rSpvD-His blieb bis zu einer Imidazolkonzentration von 30 mM in der mobilen Phase an die Säule gebunden. Bei einer Imidazolkonzentration von 45 bis 500 mM eluierte das Fusionsprotein vollständig und war in hochreiner Form im Eluat wiederzufinden. Allerdings mußte festgestellt werden, daß alle Elutionsfraktionen in geringen Mengen auch noch andere, kontaminierende Banden mit molekularen Massen von 61 und 69 kDa enthielten. Um diese Kontaminationen zu eliminieren, wurden in einer Reihe von Versuchsläufen verschiedene Parameter der Aufreinigung moduliert, u.a. die Umgebungstemperatur während der Elution (4°C, 20°C), die pH-Werte der Puffer (pH 6,5 / pH 7,9 / pH 8,5), und es wurde ein Batch-Verfahren zur Bindung von rSpvD-His an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix ausprobiert. Jedoch führte keiner dieser Versuche zu einem völlig reinen Endprodukt (Daten nicht gezeigt). Es wurde daher versucht, das säulenchromatographisch vorgereinigte Material in einem zweiten Schritt mittels präparativer SDS-PAGE nachzureinigen. Das Ergebnis eines solchen Reinigungslaufes ist in der **Abbildung 12** wiedergegeben. Durch diese Vorgehensweise gelang es schließlich, das rekombinante SpvD-Fusionsprotein von den restlichen Proteinkontaminanten zu trennen. Mit Hilfe der derart erweiterten Aufreinigungsmethode konnten aus einem Liter *E.coli*-Bouillonkultur letztendlich ca. 2,3 mg (je nach Lauf 0,75 bis 3,9 mg) hochgradig aufgereinigtes rSpvD-His gewonnen werden.



**Abbildung 11:** Proteinprofile eines *E.coli*-Bakterienzelllysates und verschiedener Fraktionen des Eluats bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung des rSpvD-His an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule. (12,5 %-iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung) Die Beladung jeder Spur entspricht 20 µl des Bakterienzelllysates. **Spur 1:** Bakterienzelllysate vor der Aufreinigung;  
**Spur 2:** Eluat bei Auftrag der Probe;  
**Spuren 3-5:** Eluat bei Auftrag des Ni<sup>2+</sup>-NTA-Waschpuffers (**3:** 5 mM Imidazol, **4:** 30 mM Imidazol, **5:** 60 mM Imidazol);  
**Spuren 6-7:** Eluat bei Auftrag des Ni<sup>2+</sup>-NTA-Elutionspuffers (100 mM Imidazol);  
**MM:** Molekularmassenmarker SeeBlue;  
◀ = rSpvD-His;  
◁ = kontaminierende Komponenten.



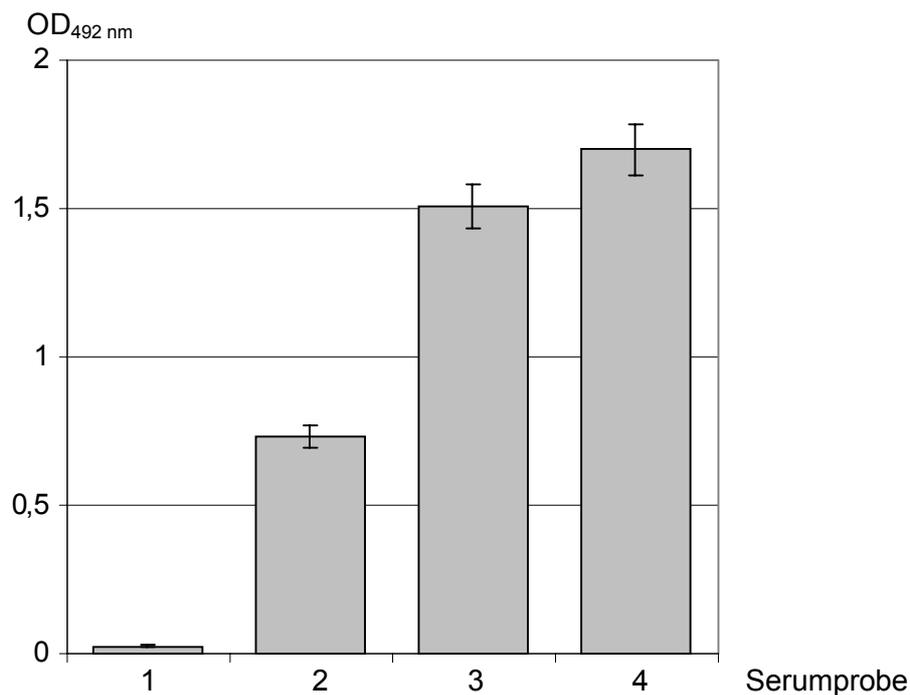
**Abbildung 12:** Ergebnis der Aufreinigung von rSpvD-His mittels präparative SDS-PAGE.  
**A:** Schematische Darstellung des Elutionsverlaufes anhand der optischen Dichte des Durchflusses bei 278 nm.  
**B:** Proteinprofil der Eluatfraktion nach Entsalzung und Volumeneinengung (12,5 %-iges SDS-PA-Gel nach Silberfärbung, Probenauftrag in der Spur 3,7 µg Protein).  
**MM:** Molekularmassenmarker SeeBlue;  
**Spur 1:** Eluat-Fraktion.

## 4.4 Untersuchungen zur Immunogenität des SpvD

### 4.4.1 Immunisierungsversuch am Kaninchen

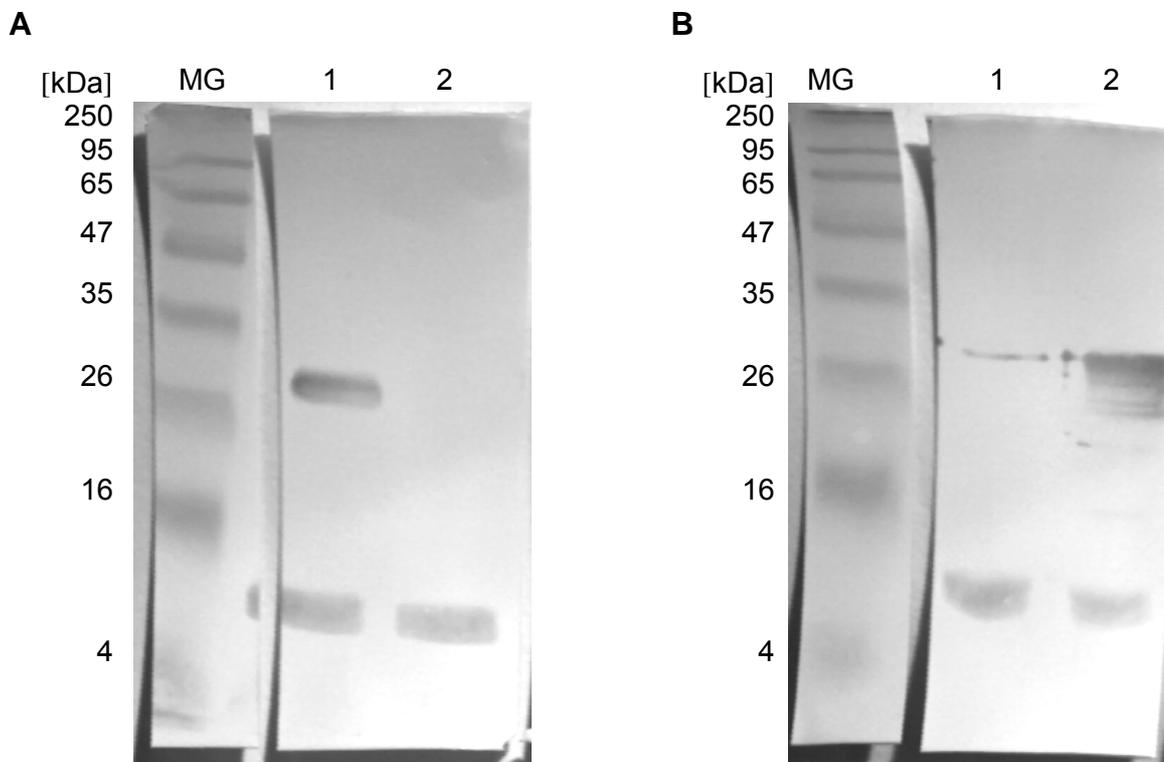
Das säulenchromatographisch aufgereinigte Fusionsprotein rSpvD-His wurde in einem Gemisch mit inkompletem Freundschens Adjuvans mehrmals subkutan an ein Kaninchen verimpft. Unmittelbar vor der ersten und jeweils 10 Tage nach der zweiten, dritten und vierten Impfung wurden dem Kaninchen Blutproben entnommen und die spezifischen Ig-Antikörpertiter in einem rSpvD-His-ELISA bestimmt (**Abbildung 13**).

Bereits nach der zweiten Impfung war ein deutlicher Anstieg im SpvD-spezifischen Ig-Gehalt des Serums zu beobachten. Auch nach der dritten und vierten Impfung waren deutlich höhere Titer als jeweils vorher festzustellen (siehe **Abbildung 13**).



**Abbildung 13:** Dynamik des rSpvD-His-spezifischen Serum-Ig-Titers beim Kaninchen nach Impfung mit rSpvD-His-Impfstoff. (Ergebnisse im rSpvD-His-ELISA, Serumverdünnung 1:16.000) Zeitpunkt der Probenahme:  
1: vor der ersten Impfung (Tag 0);  
2: zwei Wochen nach der zweiten Impfung (Tag 33);  
3: zwei Wochen nach der dritten Impfung (Tag 54);  
4: zwei Wochen nach der vierten Impfung (Tag 75).

Im Immunoblot konnte die spezifische Bindung zwischen rSpvD-His und den Antikörpern des Kaninchens verifiziert werden. Hierzu wurden von den mit IPTG-behandelten *E.coli*-Stämmen BLR(DE3)/pHIT-IV-2 und RU244 (Kontrollstamm) Bakterienzellysate hergestellt, die Proteine mittels SDS-PA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach Zugabe des Serums des mit rSpvD-His geimpften Kaninchens (Serumprobe 4) kam nur zu Bindung von Antikörpern an rSpvD-His, nicht an ein anderes rekombinantes Histidin-Fusionsprotein (rHis-SpvC, siehe **Abbildung 14**). Außer einer unspezifischen Bande bei ca. 8 MDa, welche aber auch durch ein SpvC-spezifisches Immuneserum (**25**) erkannt wurde, wurde kein weiteres Signal erzeugt.



**Abbildung 14:** Nachweis spezifischer Antikörperbindung im Kaninchen-Immuneserum. (Westernblot eines 12,5 %-igen SDS-PA-Gels, Probenauftrag ca. 20 µg Gesamtprotein je Spur, Serumverdünnung 1:1.000)

- A:** Immunoblot mit Immuneserum des mit rSpvD-His geimpften Kaninchens (Serumprobe 4);
- B:** Immunoblot mit Immuneserum eines mit rHis-SpvC geimpften Kaninchens (**25**);
- MG:** Molekularmassenmarker SeeBlue.
- Spur 1:** Bakterienzellysate des *E.coli*-Stamm BLR(DE3)/pHIT-IV-2 nach Anzucht mit 15,6 µM IPTG;
- Spur 2:** Bakterienzellysate des *E.coli*-Stamm RU244 nach Anzucht mit 40 µM IPTG.

#### 4.4.2 Humorale Immunantwort gegen SpvD bei salmonelleninfizierten BALB/c-Mäusen

In diesem Untersuchungsabschnitt sollte der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Maße Antikörper gegen SpvD bei einer oralen Salmonelleninfektion gebildet werden. Hierzu wurden 6 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse mit *spvD*-positiven Salmonellen der Serovare Dublin, Enteritidis und Typhimurium oral inokuliert. Nach der Inokulation wurden die Tiere beobachtet und der Eintritt, die Dauer, der Schweregrad und die Symptome einer Erkrankung sowie die Überlebenszeit der Tiere (ab Zeitpunkt der Inokulation) registriert. Spätestens am Ende des Beobachtungszeitraumes (21 Tage nach der Inokulation) wurden alle Tiere euthanasiert, Blutserumproben entnommen, und pathologisch-anatomische Untersuchungen durchgeführt. Ferner wurden die Milzen und Lebern der Tiere steril entnommen, gewogen und kulturell-bakteriologisch auf die Anzahl an eingewanderten Salmonellen untersucht. Der Versuchsablauf und die Ergebnisse der klinischen Untersuchung sind in der **Tabelle 21** schematisch wiedergegeben.

Das Spektrum der festgestellten Symptome und die pathologisch-anatomischen Veränderungen der inneren Organe waren in allen Versuchsgruppen einheitlich und unabhängig vom Serovar der verabreichten Salmonellen. Im Mittel wurden aus den Milzen mehr Salmonellen reisoliert als aus den Lebern der infizierten Mäuse. Auch für Inkubationszeit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Serovaren festgestellt werden. Dagegen unterschieden sich *S. Dublin*-infizierte Mäuse bezüglich klinischer Befunde deutlich von den anderen Gruppen. So lebten im Gegensatz zu *S. Enteritidis*- und *S. Typhimurium*-infizierten Mäusen die mit dem *S. Dublin*-Stamm infizierten Tiere länger und waren zudem länger, wenn auch weniger schwer erkrankt, je höher die Inokulationsdosis war.

##### Klinische Befunde

Nach einer Inkubationszeit von 3-8 Tagen zeigten 26 der 27 infizierten Tiere klinische Symptome wie ein gesträubtes Haarkleid, einen aufgekrümmten Rücken und eine meist erst einseitige, dann beidseitige seröse Konjunktivitis (siehe **Tabelle 21**). Bei schwerem Krankheitsverlauf wurden die Tiere nach weiteren 2-3 Tagen zunehmend apathisch und nahmen seltener Futter auf. Die Konjunktivitis wurde eitrig. Bei keinem der Tiere wurde eine Diarrhoe diagnostiziert. Unabhängig vom verabreichten Salmonellen-Serovar traten in den Tiergruppen Todesfälle auf. Am meisten Tiere starben in den mit dem *S. Typhimurium*-Stamm inokulierten Tiergruppen (7 von 9), am wenigsten starben Tiere in den Tiergruppen, die mit dem *S. Dublin*-Stamm inokuliert worden waren (5 von 9). Beide Indizes für die Schwere der Erkrankung und die Überlebensdauer und die eingesetzte Infektionskeimzahl korrelierten nicht

(siehe **Tabellen 22 bis 25**). Dies galt sowohl für die Betrachtung aller Tiere als auch für die isolierte Betrachtung nach den Serovaren Dublin und Typhimurium. *S. Enteritidis*-infizierte Tiere erkrankten umso schwerer (gemessen am mittleren täglichen klinischen Index während der Erkrankungsdauer, mtKI), je höher die Inokulationsdosis war ( $r = 0,718$ ;  $p = 0,029$ ). Bei *S. Enteritidis*-infizierten Tieren waren die schwerer erkrankten Tiere (gemessen am summierten klinischen Index, sKI) auch signifikant länger krank ( $r = 0,821$ ;  $p = 0,007$ ). Mit *S. Dublin* inokulierte Mäuse waren um so kürzer und schwerer krank (mtKI), je länger die Inkubationszeit dauerte ( $r = -0,877$  bzw.  $r = 0,956$ ;  $p = 0,004$  bzw.  $p \leq 0,001$ ).

Die Tiere der Kontrollgruppe blieben während der gesamten Versuchsdauer unauffällig.

### Post mortem-Befunde

Alle *Salmonella*-infizierten Tiere wiesen bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung Veränderungen auf. Vor allem Leber und Milz waren mit multiplen Nekrosen und/oder Mikroabszessen durchsetzt. In den Dünndarmabschnitten waren Hämorrhagien und/oder ödematöse Schwellungen der Darmwand zu beobachten. Die Lebern von Tieren der Gruppen 1, 4, 6 und 8 waren im Mittel signifikant schwerer als die der Kontrolltiere, ebenso die Milzen von Tieren der Gruppen 1, 3, 4 und 7 ( $p < 0,05$ , siehe **Tabelle 26**). Besonders auffällig waren die Organe einer Maus aus der Gruppe der mit ca.  $10^7$  KbE des *Salmonella*-Dublin-Stammes belasteten Tiere (Gruppe 1), deren Milz ca. 10mal und deren Leber ca. 1,7mal so schwer war, wie die entsprechenden schwersten Organe der Kontrolltiere. Dieses Tier war vom 3. bis 13. Tag nur gering- bis mittelgradig erkrankt und hatte bis zum Versuchsende am 21. Tag überlebt.

Zur Quantifizierung der Invasivität der verabreichten Salmonellen wurden die Keimzahlen in Milzen und Lebern bestimmt und anschließend auf 1 g Organmasse standardisiert. In der **Tabelle 26** sind die Meßwerte dargestellt. Bei allen Tieren, die vor dem Versuchsende am Tag 21 starben bzw. getötet wurden, konnten Salmonellen sowohl in der Milz, als auch in der Leber nachgewiesen werden. Bei den Tieren, die bis zum 21. Tag überlebten, konnten nur noch in zwei Fällen (Tiere 1 und 2 aus Gruppe 1) Salmonellen isoliert werden, wobei dies in einem Fall auch nur nach Anreicherung gelang. Die hierbei im Gruppenmittel für die Lebern und die Milzen ermittelten Werte korrelierten hoch signifikant miteinander und dies sowohl bei Betrachtung aller Tiere als auch bei isolierter Betrachtung der Gruppen ( $r = 0,948$  bis  $r = 0,998$ ;  $p \leq 0,001$ ; siehe **Tabellen 22 bis 25**). In den Milzen waren im Durchschnitt 11mal so viele Salmonellen nachweisbar wie in der Leber. Bei den Kontrolltieren waren Salmonellen nicht nachweisbar.

Bei statistischer Analyse der Werte von allen Tieren korrelierten sowohl die Keimzahlen in der Milz als auch die Keimzahlen in der Leber jeweils signifikant mit dem Lebergewicht ( $r = 0,476$  bzw.  $r = 0,521$ ;  $p = 0,008$  bzw.  $p = 0,003$ ). Legte man nur die Daten der jeweils infizierten Tiere zugrunde, ließ sich dieser Zusammenhang nur für *S. Dublin*-infizierte Mäuse und nur für die Keimzahl in der Leber und dem Lebergewicht sichern ( $r = 0,698$ ;  $p = 0,037$ ).

Bei den mit *S. Dublin* infizierten Tieren korrelierte das Lebergewicht positiv mit der Erkrankungsdauer ( $r = 0,667$ ;  $p = 0,050$ ), bei den *S. Typhimurium*-infizierten Tieren das Milzgewicht ( $r = 0,779$ ;  $p = 0,013$ ). Je schwerer die Tiere infolge der Infektion erkrankt waren (mtKI, sKI), desto intensiver waren Lebern und Milzen mit Salmonellen infiziert ( $r = 0,687$  bis  $r = 0,993$ ;  $p = 0,041$  bis  $p \leq 0,001$ ). Im gleichen Sinne war die Überlebensdauer stets negativ mit der Keimzahl korreliert ( $r = -0,807$  bis  $r = -0,993$ ;  $p = 0,009$  bis  $p \leq 0,001$ ).

### Serologische Befunde

Die Serumproben der Mäuse wurden zwischen dem 5. und 22. p. inf. gewonnen und anschließend im ELISA auf Antikörper gegen unterschiedliche *Salmonella*-Antigene untersucht. Bei den Antigenen handelte es sich um Bakterienzellysate der zur Infektion verwendeten *Salmonella*-Infektionsstämme (BZL), um gereinigtes Lipopolysaccharid von *Salmonella Typhimurium* und *Enteritidis* (LPS) sowie um aufgereinigtes rSpvD-His. In allen drei ELISA-Systemen, BZL-, LPS- und rSpvD-His-ELISA, war es möglich, spezifische Antikörper in den Serumproben der Mäuse nachzuweisen (siehe **Tabelle 27** und **Abbildung 15**). Die Titer aller drei ELISA-Systeme korrelierten hoch signifikant positiv miteinander ( $r = 0,887$  bis  $r = 0,935$ ;  $p \leq 0,001$ ; siehe **Tabelle 28**). Die höchsten Titer in allen Systemen wurden stets von den Serumproben der Tiere 1 und 2 der Gruppe 1 (Infektion mit ca.  $10^7$  KbE *S. Dublin*) erreicht.

Zusätzlich wurden Cut-Off-Werte für jedes ELISA-System bestimmt. Für den Cut-Off wurde aus den gegen das entsprechende Antigen erzielten Titerwerten der Kontrolltiere der arithmetische Mittelwert gebildet und die dreifache Standardabweichung addiert.

Im autologen BZL-ELISA wurden die höchsten Titer gemessen (Titer bis 2,6; siehe **Abbildung 15**). Die Mittelwertunterschiede zwischen den Testgruppen sowie der Kontrollgruppe waren nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Allerdings korrelierten die Titerwerte der Tiere signifikant positiv mit der Menge der inokulierten Salmonellen ( $r = 0,488$ ;  $p = 0,018$ ), mit der Dauer der Erkrankung ( $r = 0,633$ ;  $p = 0,001$ ) und dem Milz- ( $r = 0,704$ ;  $p \leq 0,001$ ) und Lebergewicht ( $r = 0,619$ ;  $p = 0,002$ ; siehe **Tabelle 29**). Anhand der für jedes Antigen festgesetzten Cut-Off-Werte (BZL<sub>*S. Dublin*</sub> = 0,149; BZL<sub>*S. Enteritidis*</sub> = 0,127; BZL<sub>*S. Typhimurium*</sub> = 0,087) wurden in diesem ELISA-System insgesamt 8 Mäuse als serologisch positiv eingestuft.

Zur Untersuchung auf spezifische Serum-Ig-Titer gegen Salmonellen-LPS wurden Mäuse, die mit dem *S. Dublin*- oder dem *Enteritidis*-Stamm infiziert worden waren, auf Antikörper gegen LPS von *S. Enteritidis* (LPS<sub>Ent</sub>) getestet und *S. Typhimurium* (LPS<sub>Tm</sub>) infizierte Mäuse auf Antikörper gegen das LPS von *S. Typhimurium* (siehe **Abbildung 16**). Mit dem LPS-Antigenen konnten nur sehr niedrige Titer ( $\leq 0,37$ ) nachgewiesen werden. Im Mittel waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe nachweisbar ( $p > 0,05$ ). Die Titer aller Tiere zeigten eine signifikant positive Korrelation mit der Infektionsdosis ( $r = 0,465$ ;  $p = 0,039$ ), der Dauer der Erkrankung ( $r = 0,595$ ;  $p = 0,006$ ) sowie dem Leber- ( $r = 0,493$ ;  $p = 0,027$ ) und dem Milzgewicht ( $r = 0,634$ ;  $p = 0,003$ , **Tabelle 29**). Mit Ausnahme der Korrelation zwischen Titer und Dauer der Erkrankung waren die Korrelationskoeffizienten mit dem LPS-ELISA stets am niedrigsten. In diesem ELISA-System wurden nach Definition der Cut-Offs (LPS<sub>Ent</sub> = 0,124; LPS<sub>Tm</sub> = 0,135) zwei Mäuse als serologisch positiv erkannt.

Im rSpvD-His-ELISA wurden nur sehr niedrige Titer gemessen (Titer  $< 0,3$ ; siehe **Abbildung 17**). Die ermittelten Titer korrelierten insgesamt signifikant positiv mit der Mengen der inokulierten Salmonellen ( $r = 0,466$ ;  $p = 0,025$ ), mit der Dauer der Erkrankung ( $r = 0,546$ ;  $p = 0,007$ ), mit dem Lebergewicht ( $r = 0,602$ ;  $p = 0,002$ ) und auch mit dem Milzgewicht ( $r = 0,820$ ;  $p \leq 0,001$ ; siehe **Tabelle 29**). Anhand des rSpvD-His-ELISAs wurden zwei Tiere als serologisch positiv eingestuft (Cut-Off = 0,123).

**Tabelle 21:** Nachweis von Krankheitssymptomen bei BALB/c-Mäusen nach oraler Inokulation von Salmonellen.

Gruppe	Challenge-Serovar, -Stamm und -Dosis	Tier- Nr.	täglicher Krankheitsgrad																			mtKI	sKI						
			0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.			19.	20.	21. Tag			
<b>0</b>	Kontrollgruppe	1	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>1</b>	Dublin 442/012 8.000.000 KbE	1	I	0	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	12	
		2	I	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	9	
		3	I	0	0	1	1	1	0	0	0	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1,1	50	
<b>2</b>	Dublin 442/012 80.000 KbE	1	I	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8	6		
		2	I	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1,2	44	
		3	I	0	0	0	1	1	1	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,0	58	
<b>3</b>	Dublin 442/012 700 KbE	1	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		2	I	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	62	
		3	I	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,7	52	
<b>4</b>	Enteritidis SE147 6.000.000 KbE	1	I	0	0	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70		
		2	I	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70	
		3	I	0	0	2	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,8	71	
<b>5</b>	Enteritidis SE147 60.000 KbE	1	I	0	0	1	1	0	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	1,8	65		
		2	I	0	0	2	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70		
		3	I	0	0	2	1	0	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,0	66	
<b>6</b>	Enteritidis SE147 700 KbE	1	I	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2		
		2	I	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2		
		3	I	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2	
<b>7</b>	Typhimurium 421/101 9.000.000 KbE	1	I	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70		
		2	I	0	0	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3,0	73	
		3	I	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70	
<b>8</b>	Typhimurium 421/101 80.000 KbE	1	I	0	0	1	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,3	69		
		2	I	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,5	70	
		3	I	0	0	1	1	1	2	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,0	60	
<b>9</b>	Typhimurium 421/101 600 KbE	1	I	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2		
		2	I	0	0	1	1	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2,0	66	
		3	I	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0	2	

**Erläuterungen:** **0** = keine Symptome; **1** = gering-; **2** = mittel-; **3** = hochgradige Symptomatik; **4** = Tod infolge der Infektion; **I** = Inokulation; **mtKI** = mittlerer täglicher klinischer Index während der Erkrankungsdauer; **sKI** = summierter klinischer Index.

**Tabelle 22:** Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und post mortem-Befunden bei oral mit Salmonellen infizierten BALB/c-Mäusen (n = 30).

		Inkuba- tions- zeit	Erkran- kungs- dauer	Über- lebens- zeit	Milz- gewicht	Leber- gewicht	Milz- KbE	Leber- KbE	mtKI	sKI
Infektions- dosis	r	-0,264	0,229	-0,296	0,352	0,229	0,296	0,300	0,349	0,310
	p	0,192	0,108	0,112	0,056	0,223	0,112	0,108	0,059	0,096
Inkubations- zeit	r	-	-0,068	-0,115	0,080	0,334	0,199	0,210	0,271	0,119
	p	-	0,740	0,575	0,697	0,096	0,331	0,304	0,181	0,561
Erkrankungs- dauer	r	-	-	-0,113	<b>0,587</b>	<b>0,597</b>	<b>0,386</b>	<b>0,410</b>	0,130	0,180
	p	-	-	0,553	<b>0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>0,035</b>	<b>0,025</b>	0,493	0,341
Überlebens- zeit	r	-	-	-	0,048	-0,246	<b>-0,925</b>	<b>-0,901</b>	<b>-0,900</b>	<b>-0,996</b>
	p	-	-	-	0,803	0,190	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>
Milzgewicht	r	-	-	-	-	<b>0,563</b>	0,173	0,297	0,057	0,004
	p	-	-	-	-	<b>0,001</b>	0,361	0,111	0,764	0,982
Lebergewicht	r	-	-	-	-	-	<b>0,476</b>	<b>0,521</b>	0,301	0,300
	p	-	-	-	-	-	<b>0,008</b>	<b>0,003</b>	0,106	0,107
Milz-KbE	r	-	-	-	-	-	-	<b>0,983</b>	<b>0,833</b>	<b>0,947</b>
	p	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>
Leber-KbE	r	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,816</b>	<b>0,926</b>
	p	-	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>

Erläuterungen: siehe Tabelle 25.

**Tabelle 23:** Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und post mortem-Befunden bei oral mit S. Dublin infizierten BALB/c-Mäusen (n = 9).

		Inkuba- tions- zeit	Erkran- kungs- dauer	Über- lebens- zeit	Milz- gewicht	Leber- gewicht	Milz- KbE	Leber- KbE	mtKI	sKI
Infektions- dosis	r	-0,622	0,573	0,335	0,451	0,418	0,008	-0,005	-0,254	-0,265
	p	0,100	0,107	0,378	0,223	0,263	0,984	0,989	0,509	0,491
Inkubations- zeit	r	-	<b>-0,877</b>	-0,699	-0,194	0,075	0,481	0,447	<b>0,956</b>	0,668
	p	-	<b>0,004</b>	0,054	0,646	0,860	0,228	0,267	<b>≤ 0,001</b>	0,070
Erkrankungs- dauer	r	-	-	0,175	0,485	<b>0,667</b>	0,206	0,255	-0,147	-0,050
	p	-	-	0,652	0,186	<b>0,050</b>	0,595	0,508	0,705	0,899
Überlebens- zeit	r	-	-	-	0,255	-0,360	<b>-0,879</b>	<b>-0,807</b>	<b>-0,793</b>	<b>-0,990</b>
	p	-	-	-	0,508	0,342	<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>	<b>≤ 0,001</b>
Milzgewicht	r	-	-	-	-	0,557	0,086	0,327	-0,004	-0,166
	p	-	-	-	-	0,119	0,826	0,390	0,992	0,669
Lebergewicht	r	-	-	-	-	-	0,646	<b>0,698</b>	0,578	0,470
	p	-	-	-	-	-	0,060	<b>0,037</b>	0,103	0,202
Milz-KbE	r	-	-	-	-	-	-	<b>0,948</b>	<b>0,736</b>	<b>0,929</b>
	p	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>0,024</b>	<b>≤ 0,001</b>
Leber-KbE	r	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,687</b>	<b>0,863</b>
	p	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,041</b>	<b>0,003</b>

Erläuterungen: siehe Tabelle 25.

**Tabelle 24:** Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und post mortem-Befunden bei oral mit S. Enteritidis infizierten BALB/c-Mäusen (n = 9).

		Inkuba- tions- zeit	Erkran- kungs- dauer	Über- lebens- zeit	Milz- gewicht	Leber- gewicht	Milz- KbE	Leber- KbE	mtKI	sKI
Infektions- dosis	r		0,115	-0,538	<b>0,756</b>	0,565	0,535	0,596	<b>0,718</b>	0,544
	p	k. B.	0,769	0,135	<b>0,018</b>	0,113	0,137	0,110	<b>0,029</b>	0,130
Inkubations- zeit	r	-	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
Erkrankungs- dauer	r			<b>-0,824</b>	-0,098	0,115	<b>0,829</b>	<b>0,797</b>	0,586	<b>0,821</b>
	p	-	-	<b>0,006</b>	0,803	0,769	<b>0,006</b>	<b>0,010</b>	0,097	<b>0,007</b>
Überlebens- zeit	r				-0,355	-0,316	<b>-0,993</b>	<b>-0,991</b>	<b>-0,935</b>	<b>-1,000</b>
	p	-	-	-	0,349	0,408	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>
Milzgewicht	r					-0,018	0,292	0,325	0,608	0,364
	p	-	-	-	-	0,963	0,446	0,393	0,082	0,335
Lebergewicht	r						0,390	0,401	0,318	0,311
	p	-	-	-	-	-	0,300	0,285	0,404	0,415
Milz-KbE	r							<b>0,998</b>	<b>0,921</b>	<b>0,993</b>
	p	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>
Leber-KbE	r								<b>0,940</b>	<b>0,991</b>
	p	-	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>

Erläuterungen: siehe **Tabelle 25**.

**Tabelle 25:** Zusammenhänge zwischen klinischen Parametern und post mortem-Befunden bei oral mit S. Typhimurium infizierten BALB/c-Mäusen (n = 9).

		Inkuba- tions- zeit	Erkran- kungs- dauer	Über- lebens- zeit	Milz- gewicht	Leber- gewicht	Milz- KbE	Leber- KbE	mtKI	sKI
Infektions- dosis	r		-0,213	-0,478	0,279	-0,303	0,181	0,196	0,636	0,449
	p	k. B.	0,583	0,193	0,468	0,427	0,642	0,613	0,066	0,225
Inkubations- zeit	r	-	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.	k. B.
Erkrankungs- dauer	r			-0,209	<b>0,779</b>	0,590	0,453	0,497	0,108	0,302
	p	-	-	0,586	<b>0,013</b>	0,094	0,220	0,173	0,782	0,429
Überlebens- zeit	r				-0,502	-0,434	<b>-0,918</b>	<b>-0,921</b>	<b>-0,951</b>	<b>-0,995</b>
	p	-	-	-	0,168	0,244	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>	<b>≤ 0,001</b>
Milzgewicht	r					0,637	0,531	0,595	0,415	0,564
	p	-	-	-	-	0,065	0,142	0,091	0,266	0,113
Lebergewicht	r						0,576	0,585	0,262	0,471
	p	-	-	-	-	-	0,104	0,098	0,496	0,201
Milz-KbE	r							<b>0,993</b>	<b>0,835</b>	<b>0,940</b>
	p	-	-	-	-	-	-	<b>≤ 0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>≤ 0,001</b>
Leber-KbE	r								<b>0,817</b>	<b>0,947</b>
	p	-	-	-	-	-	-	-	<b>0,007</b>	<b>≤ 0,001</b>

Erläuterungen: r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Signifikanz; k. B. = keine Berechnung, da eine der Variablen konstant war; KbE = Besiedelung von Lebern und Milzen mit Salmonellen; mtKI = mittlerer täglicher klinischer Index während der Erkrankungsdauer; sKI = summierter klinischer Index.

**Tabelle 26:** Organgewicht und quantitativer Nachweis von Salmonellen in Leber und Milz von oral infizierten BALB/c-Mäusen.

Gruppe	n	Challenge-Serovar und -Dosis	Leber				Milz				
			Gewicht [g]		KbE-Bestimmung [log10/g]		Gewicht [g]		KbE-Bestimmung [log10/g]		
			MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
0	3	Kontrollgruppe	1,11	0,015	k.N.		0,14	0,044	k.N.		
1	3 <sup>1)</sup>	Dublin	8.000.000 KbE	1,60*	0,313	7,00	0,29	0,63*	0,676	6,15	2,51
2	3	Dublin	80.000 KbE	1,34	0,212	5,21	4,52	0,30	0,129	6,23	5,40
3	3	Dublin	700 KbE	1,41	0,168	4,88	4,28	0,25*	0,101	5,96	5,26
4	3	Enteritidis	6.000.000 KbE	1,23*	0,085	7,44	0,46	0,23*	0,015	9,26	0,33
5	3	Enteritidis	60.000 KbE	1,02	0,302	6,79	0,83	0,16	0,052	8,91	0,84
6	3	Enteritidis	700 KbE	1,01*	0,010	k.N.		0,17	0,006	k.N.	
7	3	Typhimurium	9.000.000 KbE	1,11	0,136	6,94	0,75	0,27*	0,070	8,35	1,54
8	3	Typhimurium	80.000 KbE	1,48*	0,246	8,27	0,49	0,28	0,110	10,03	0,16
9	3	Typhimurium	600 KbE	1,05	0,130	2,92	5,06	0,17	0,050	3,32	5,75

**Erläuterung:** 1) Bei Keimzahlbestimmung in der Leber wurden nur 2 Tiere der Gruppe 1 berücksichtigt, da bei Tier Nr. 2 nur nach Anreicherung Salmonellen nachgewiesen werden konnten.

**MW** = Mittelwert; **SD** = Standardabweichung; **k.N.** = keine Salmonellen nachweisbar;

\* = signifikanter Unterschied des Mittelwerts gegenüber der Kontrollgruppe (U-Test,  $p < 0,05$ ).

**Tabelle 27:** Anteil seropositiver BALB/c-Mäuse in verschiedenen Salmonellen spezifischen ELISA-Systemen nach oraler Salmonelleninfektion (ELISA-Ergebnisse).

Gruppe	Challenge-Serovar und -Dosis	Überlebensdauer [MW]	mtKI [MW]	sKI [MW]	ELISA-Ergebnisse (Anzahl seropositiver Tiere / Anzahl geteste Tiere)			
					autologes BZL	homologes LPS	rSpvD-His	
0	Kontrollgruppe	0	22	0	0	0/3	0/1	0/3
1	Dublin	8.000.000 KbE	17,7	1,1	23,7	3/3	2/3	2/3
2	Dublin	80.000 KbE	14,7	1,3	36,0	1/2	0/1	0/2
3	Dublin	700 KbE	13	1,7	38,0	1/1	0/1	0/1
4	Enteritidis	6.000.000 KbE	6	2,6	70,3	1/3	0/3	0/3
5	Enteritidis	60.000 KbE	6,7	2,1	67,0	0/3	0/3	0/3
6	Enteritidis	700 KbE	22	1,0	2,0	0/3	0/3	0/3
7	Typhimurium	9.000.000 KbE	5,7	2,7	71,0	1/2	0/2	0/2
8	Typhimurium	80.000 KbE	7,3	2,3	66,3	0/1	0/1	0/1
9	Typhimurium	600 KbE	16,3	1,3	23,3	1/2	0/2	0/2

**Erläuterungen:** **BZL** = Bakterienzellysate; **n** = Anzahl der Meßwerte; **mtKI** = mittlerer täglicher klinischer Index während der Erkrankungsdauer; **sKI** = summierter klinischer Index.



**Tabelle 28:** Korrelation zwischen Serum-Ig-Titer gegen drei verschiedenen *Salmonellen*-Antigene bei oral mit *Salmonellen* infizierten BALB/c-Mäusen.

korrelierte Serum-Ig-Titer [Antigene]	n	r	Funktion der Regressionsgeraden	Signifikanz [p]
BZL-ELISA : rSpvD-His-ELISA	23	0,935	$y = 0,0789x + 0,0345$	< 0,001
BZL-ELISA : LPS-ELISA	20	0,907	$y = 0,1321x - 0,0136$	< 0,001
rSpvD-His-ELISA : LPS-ELISA	20	0,887	$y = 1,5326x - 0,0622$	< 0,001

**Erläuterungen:** **BZL** = Bakterienzellysat; **n** = Anzahl der Meßwerte; **r** = Korrelationskoeffizient nach Pearson.

**Tabelle 29:** Korrelation der Serum-Ig-Titern gegen verschiedene *Salmonellen*-Antigene mit der Inokulationsdosis, der Dauer der Erkrankung, sowie dem Milz- und dem Lebergewicht bei salmonelleninfizierten BALB/c-Mäusen.

Antigen	n	Inokulationsdosis		Dauer der Erkrankung		Milzgewicht		Lebergewicht	
		r	p	r	p	r	p	r	p
autologes BZL	23	0,488	0,018	0,633	0,001	0,704	≤ 0,001	0,619	0,002
homologes LPS	20	0,465	0,039	0,595	0,006	0,634	0,003	0,493	0,027
rSpvD-His	23	0,466	0,025	0,546	0,007	0,820	≤ 0,001	0,602	0,002

**Erläuterungen:** **BZL** = Bakterienzellysat; **n** = Anzahl der Meßwerte; **r** = Korrelationskoeffizient nach Pearson.

#### 4.4.3 Evaluierung eines SpvD-ELISA zur Serodiagnostik der Salmonelleninfektion beim Pferd

Das aufgereinigte rSpvD-His wurde geprüft, ob es sich als Testantigen in einem ELISA dazu eignet, um serologisch zwischen *Salmonella*-infizierten ( $n = 56$ ) und *Salmonella*-negativen ( $n = 71$ ) Pferden unterscheiden zu können (rSpvD-His-ELISA). Als „Goldstandard“ für die Bewertung der Meßwerte als „richtig positiv“ und „richtig negativ“ wurden die Befunde der kulturell-bakteriologischen Untersuchung des jeweiligen Pferdes zugrunde gelegt. Meßergebnisse in einem ELISA, in dem chromatografisch aufgereinigtes LPS von *S. Typhimurium* (LPS<sub>Tm</sub>-ELISA) als Antigen diente, wurden zum Vergleich herangezogen. Die für jede Serumprobe im LPS<sub>Tm</sub>- und im rSpvD-His-ELISA ermittelten Meßwerte wurden in prozentuale Verhältnisse zum jeweiligen Meßwert eines auf jeder Platte mitgeführten Standardserums gesetzt. Alle Titer werden daher im folgenden in „Standard-Prozent“ [Std. %] angegeben. Die so ermittelten Titer wurden für jeden ELISA mit dem Kolmogorov-Smirnov-Z-Test auf Normalverteilung geprüft. Weder im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA (Z-Wert 1,696,  $p < 0,01$ ) noch im rSpvD-His-ELISA (Z-Wert 2,274,  $p < 0,001$ ) waren die Werte normalverteilt. Aus diesem Grund wurden alle Mittelwertunterschiede nach Mann-Whitney (U-Test) und Unterschiede der Varianzen nach Kruskal-Wallis (H-Test) auf Signifikanz getestet.

In beiden Testsystemen konnten im Mittel für *Salmonella*-positive Pferde signifikant höhere Titer nachgewiesen werden, als für *Salmonella*-negative Pferde (U-Test,  $p < 0,001$ ; siehe **Tabelle 30**). Aber bei älteren Pferden waren sowohl die Titer signifikant höher und die Titervariation signifikant größer als bei jüngeren Pferden ( $p < 0,001$ ; siehe **Tabelle 31**). Daher wurden Pferde, die älter als 6 Monate waren, und jüngere Pferde in den weiteren Berechnungen stets getrennt untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Salmonellenausscheider in der Gruppe der älteren Pferde signifikant höhere Titer besaßen als die *Salmonella*-negativen Pferde dieser Altersgruppe ( $p < 0,001$ ). Bei den jüngeren Pferden war dagegen ein solcher Unterschied statistisch nicht zu sichern ( $p > 0,05$ ; siehe **Tabelle 30** und **Abbildung 16**).

Zur Beantwortung der Frage, ob die Titer des rSpvD-His-ELISA mit denen im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA korrelierten, wurden die Werte paarweise in Beziehung gesetzt und auf Korrelation und Regression geprüft. In der **Abbildung 17** ist das Ergebnis dieser Untersuchung als Streudiagramm wiedergegeben. Diese Prüfung ergab, daß die Werte des LPS<sub>Tm</sub>-ELISA mit denen des rSpvD-His-ELISA signifikant positiv korrelierten (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,668,  $p < 0,001$ ).

**Tabelle 30:** Serum-IgG-Titer bei salmonellenausscheidenden und *Salmonella*-negativen Pferden.  
(Ergebnisse im rSpvD-His- und LPS<sub>Tm</sub>-ELISA, n = 127 Pferde)

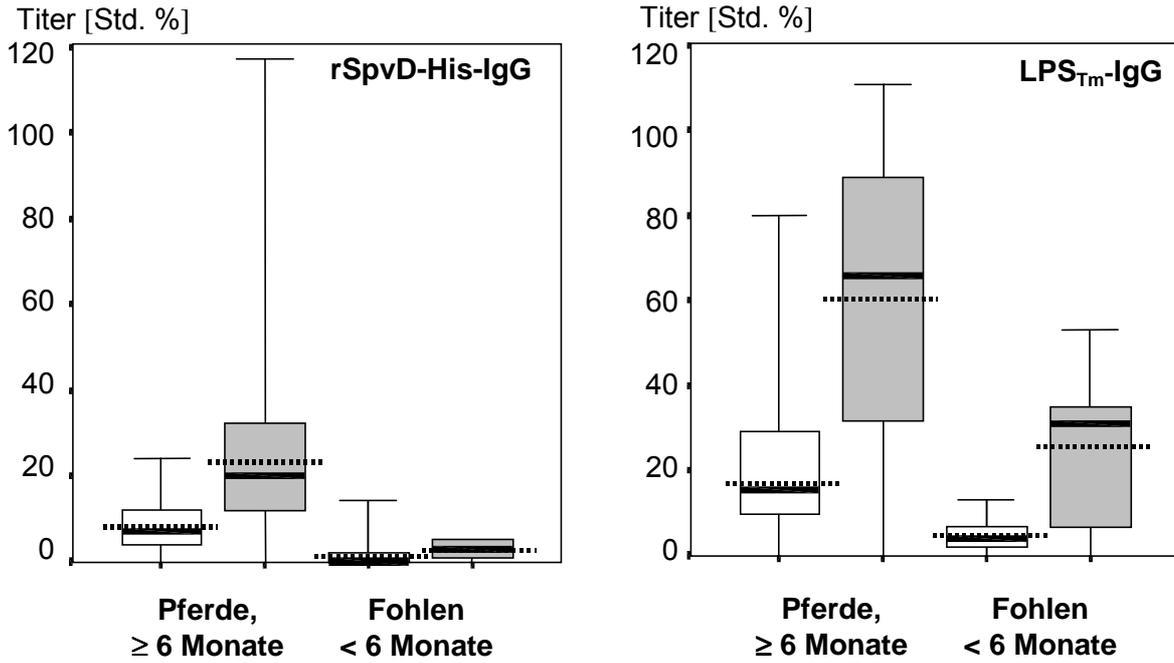
ELISA-Antigen	Alter der Pferde	Salmonellen Befund	n	Serum-IgG-Titer [Std.%]			U-Test [p]
				MW	SD	Median	
rSpvD-His	jeden Alters	negativ	71	6,90	6,24	6,0	< 0,001
		positiv	56	23,05	21,16	18,5	
	älter als 6 Monate	negativ	54	8,48	6,05	7,0	< 0,001
		positiv	51	25,04	21,14	20,0	
	jünger als 6 Monate	negativ	17	1,88	3,76	0,0	> 0,5
		positiv	5	2,80	2,28	3,0	
LPS <sub>Tm</sub>	jeden Alters	negativ	71	17,07	17,39	12,0	< 0,001
		positiv	56	57,36	33,55	53,0	
	älter als 6 Monate	negativ	54	21,83	17,94	15,5	< 0,001
		positiv	51	60,60	32,97	66,0	
	jünger als 6 Monate	negativ	17	4,59	4,06	4,0	> 0,5
		positiv	5	25,20	21,61	31,0	

**Erläuterungen:** n = Anzahl der untersuchten Werte;  
**MW** = geometrischer Mittelwert;  
**SD** = Standardabweichung.

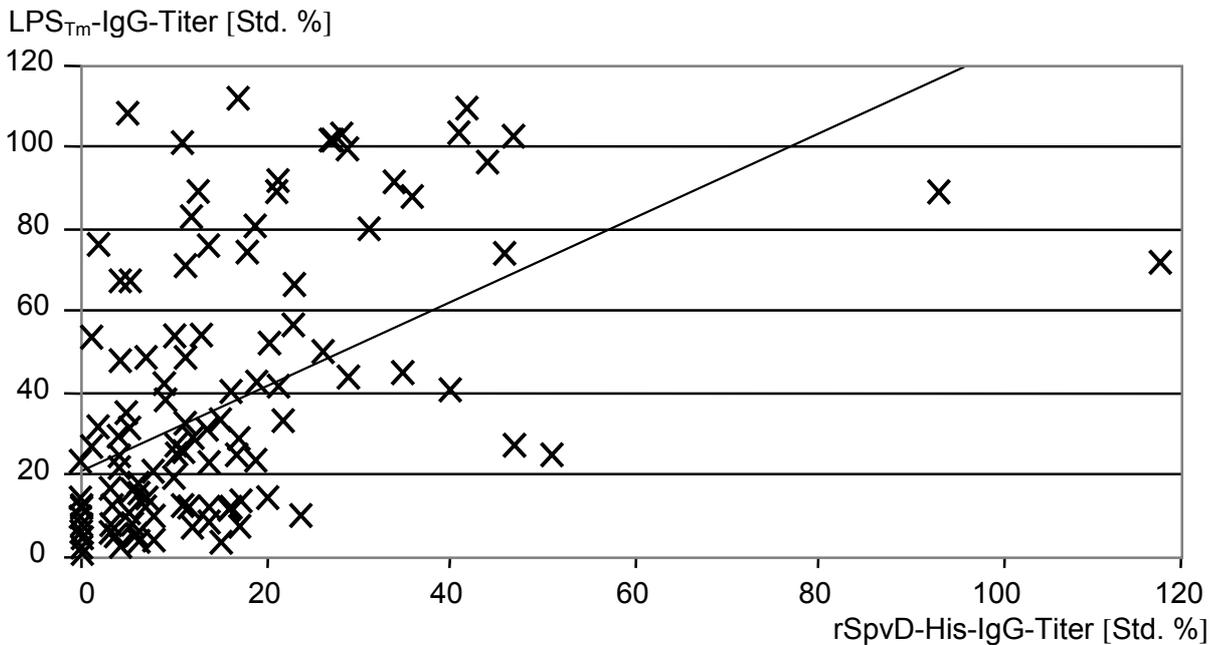
**Tabelle 31:** Vergleich von Pferden jünger als 6 Monate und älteren Pferden in ihren Serum-IgG-Titern gegen verschiedene Salmonellen-Antigene.  
(Ergebnisse im rSpvD-His- und LPS<sub>Tm</sub>-ELISA, n = 127 Pferde; nichtparametrischer Varianzanalyse [H-Test] und Mann-Whitney-Test [U-Test])

ELISA-Antigen	Alter	n	MW	SD	H-Test [p]	U-Test [p]
rSpvD-His	jünger als 6 Monate	22	2,10	3,45	< 0,001	< 0,001
	älter als 6 Monate	105	16,52	17,40		
LPS <sub>Tm</sub>	jünger als 6 Monate	22	9,27	13,41	< 0,001	< 0,001
	älter als 6 Monate	105	40,62	32,62		

**Erläuterungen:** n = Anzahl der untersuchten Werte;  
**MW** = geometrischer Mittelwert;  
**SD** = Standardabweichung.

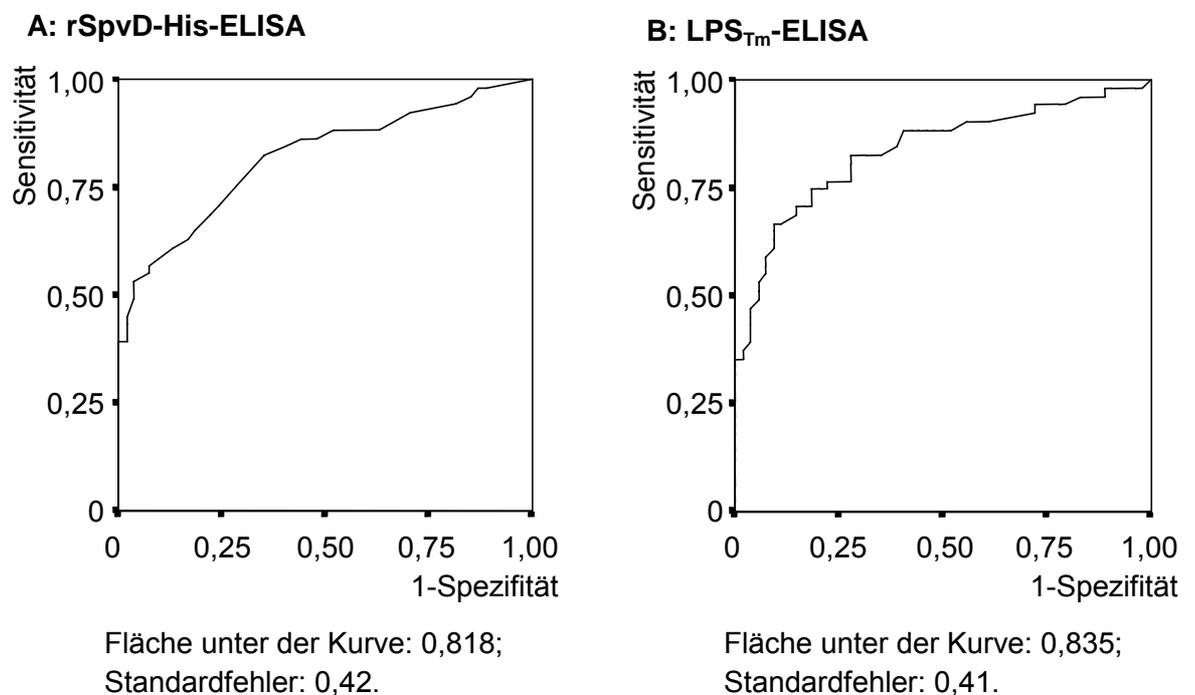


**Abbildung 16:** Serum-IgG-Titer im rSpvD-His- und LPS<sub>Tm</sub>-ELISA.  
 (Darstellung der Werteverteilung in Quartilen als Boxplots. Datengrundlage sind Serumproben von 54 *Salmonella*-negativen und 51 *Salmonella*-positiven älteren Pferden sowie von 17 negativen und 5 positiven Fohlen)  
 — = Median; ..... = geometrischer Mittelwert;  
 □ = *Salmonella*-negativ; ■ = *Salmonella*-positiv.



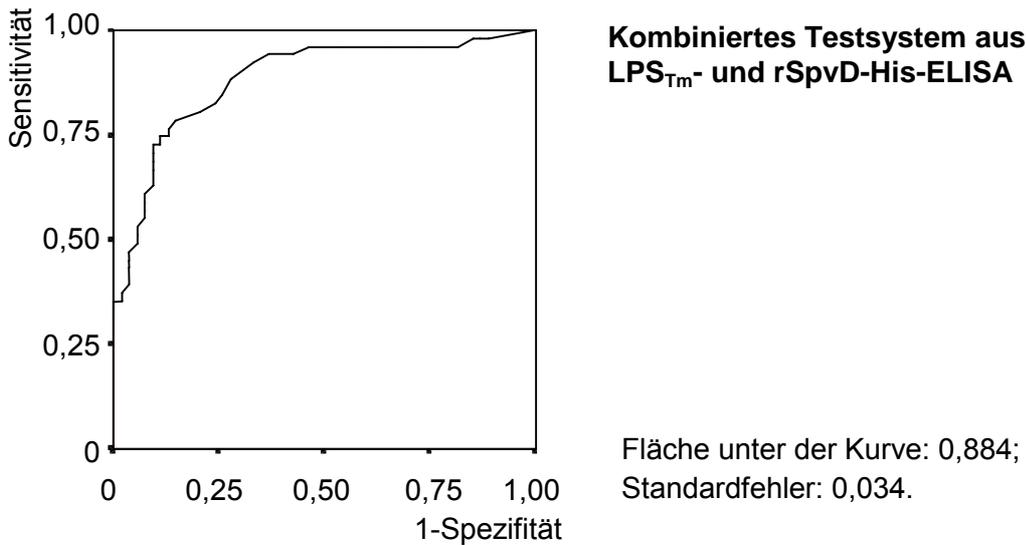
**Abbildung 17:** Korrelation zwischen den Serum-IgG-Titern aus dem LPS<sub>Tm</sub>- und dem rSpvD-His-ELISA.  
 (n = 127; r = 0,534; y = 1,0313x + 20,727, p < 0,001)

In weiteren Untersuchungen wurde der Frage nach der Sensitivität (Erkennung von Ausscheidern als serologisch positiv) und der Spezifität (Erkennung von *Salmonella*-negativen Pferden als serologisch negativ) der ELISA-Systeme nachgegangen. In **Abbildung 18** ist die gegenseitige Abhängigkeit zwischen Sensitivität und Spezifität in den beiden ELISA-Systemen in Receiver operating characteristics- (ROC-) Kurven dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, daß der LPS<sub>Tm</sub>-ELISA mit einer Fläche unter der Kurve von 0,84 gegenüber dem rSpvD-His-ELISA mit 0,82 zu einer etwas besseren Erkennung von Ausscheidern und Nichtausscheidern führte. Da sich die Wertebereiche der Salmonellenausscheider und *Salmonella*-negativen Pferden überlappten, konnte ein Cut-Off-Wert, bei dem die serologische Einstufung der Tiere in positiv und negativ exakt mit dem jeweiligen kulturell-bakteriologischen Befund übereingestimmt hätte (Sensitivität 100 % und Spezifität 100 %) weder für den LPS<sub>Tm</sub>-ELISA noch für den rSpvD-His-ELISA gefunden werden. Daher wurde für jedes System ein Cut-Off-Wert bestimmt, bei dem sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität über 70 % liegen sollten. Dieser Wert lag im rSpvD-His-ELISA-System bei 12,5 Std. %, im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA-System bei 39,0 Std. %. Bei den sich daraus ergebenden Werten für Spezifität und Sensitivität lagen die des LPS<sub>Tm</sub>-ELISA etwas höher (85,2 % und 70,6 %) als die des rSpvD-His-ELISA (75,9 % und 70,6 %; siehe **Tabelle 32**).



**Abbildung 18:** Receiver operating characteristics- (ROC-) Kurven für den rSpvD-His- (**A**) und den LPS<sub>Tm</sub>- (**B**) ELISA. (ELISA-Ergebnisse von Pferden, älter als sechs Monate [n = 105]; Einstufung der Titer in richtig positiv und negativ anhand der kulturell-bakteriologischen Befunde)

Durch die Kombination der beiden ELISA-Testsysteme konnte die Spezifität (90,2 %) bei nahezu gleichbleibender Sensitivität (70,4 %) erhöht werden. Hierzu wurden zuerst alle Serumproben im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA getestet. Proben, welche bei einem Cut-Off von 39,5 in diesem ELISA als negativ eingestuft wurden, wurden anschließend im rSpvD-His-ELISA getestet (Cut-Off 13,0 Std %; siehe **Tabelle 32** und **Abbildung 19**).



**Abbildung 19:** Receiver operating characteristics- (ROC-) Kurven für Testergebnisse aus dem LPS<sub>Tm</sub>-ELISA, mit Nachuntersuchung der negativen Tiere im rSpvD-His-ELISA. (ELISA-Ergebnisse von Pferden, älter als sechs Monate [n = 105]; Einstufung der Titer in richtig positiv und negativ anhand der kulturell-bakteriologischen Befunde)

**Tabelle 32:** Cut-Off, Sensitivität und Spezifität von ELISA-Systemen zum Nachweis von Immunglobulin G in Serumproben von Pferden älter als sechs Monate gegen verschiedene Salmonellen-Antigene.

ELISA-Antigen	Cut-Off [Std. %]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
rSpvD-His	12,5	70,6	75,9
LPS <sub>Tm</sub>	39,5	70,6	85,2
LPS <sub>Tm</sub> und rSpvD-His kombiniert	39,5 und 13,0	70,4	90,2

## 5 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Produkt des vor wenigen Jahren entdeckten *Salmonella*-spezifischen *spvD*-Gens auf seine Eignung zum Zielmolekül für die serologische Diagnostik von *Salmonella*-Infektionen untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Verbreitung und Häufigkeit des *spvD*-Gens bei den bei Tieren in Deutschland vorkommenden Salmonellen, sowie die Strukturvariabilität und die Immunogenität des Proteins SpvD.

### Vorkommen und Häufigkeit von SpvD

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Vorkommen des *spvD*-Gens bei *Salmonella*-Feldisolaten von Tieren gezielt untersucht. Frühere Arbeiten berücksichtigten dieses Gen entweder überhaupt nicht oder basierten auf dem Gebrauch so großer Gensonden, daß ein positives Hybridisierungssignal die Präsenz des *spvD*-Gens nicht garantieren konnte (**86, 195, 318**). Speziell die Daten, die aus Deutschland bisher vorlagen, konnten nicht als repräsentativ angesehen werden, da entweder nur ausgewählte Stämme oder nur eine geringe Anzahl von Stämmen untersucht wurden (**24, 164, 308**).

Nach den hier präsentierten Ergebnissen ist das *spvD*-Gen bei *Salmonella enterica*-Stämmen in Deutschland ein sehr häufiges Merkmal. Dies deckt sich mit Untersuchungen in anderen Ländern, in denen Gene aus dem *spv*-Locus ebenfalls mittels Hybridisierung oder PCR bei verschiedenen Stämmen des Genus *Salmonella* nachgewiesen werden konnten (**7, 147, 174, 205, 228, 230, 318**). Aber anders als es **ABOO ET AL.** (2000) und **BOYD & HARTL** (1998) beschrieben haben, kam das *spvD*-Gen in der vorliegenden Studie nur bei Stämmen von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* vor. Die getesteten Stämme der Subspezies *salamae* (n = 3) und VII (n = 1) besaßen das Gen nicht. Dagegen waren *spv*-homologe Sequenzen in der Untersuchung von **BOYD & HARTL** bei allen getesteten Stämmen der Subspezies *salamae* (n = 14), *arizonae* (3) und Subspezies VII (4), sowie bei zwei von 21 Stämmen der Subspezies *houtenae* nachzuweisen. **BOYD & HARTL** führten den Nachweis des *spv*-Locus mittels DNS-DNS-Hybridisierung, wobei sie eine Gensonde benutzten, die den gesamten *spv*-Locus umfaßte (**40**). Aber wie die eigenen Resultate mit den *S. Gallinarum*-Stämmen SG 9 und 9R Nobilis verdeutlichten, kann eine so große Gensonde selbst dann noch positive Hybridisierungssignale erzeugen, wenn die Sonde nur in vergleichsweise kurzen Abschnitten zur Zielsequenz komplementär ist. Im Falle der *S. Gallinarum*-Stämme SG 9 und 9R Nobilis erzeugte nämlich die verwendete *spvC/spvD*-Gensonde ein positives Signal, obwohl diesen Stämmen das *spvD*-Gen vollständig fehlte, wie die nachfolgende Sequenzie-

rung ergab (27). Daher sollten die oben genannten Ergebnisse von **BOYD & HARTL** nicht als Beweis für die Anwesenheit eines *spvD*-Gens bzw. eines kompletten *spv*-Locus bei Stämmen der Subspezies *salamae*, *arizonae*, *houtenae* und der Subspezies VII gewertet werden.

Die Häufigkeit, mit der die bei Tieren gefundenen Salmonellen *spvD*-positiv waren, schwankte von Tierart zu Tierart erheblich. Bei Rindern und Pferden war der Prozentsatz der *spvD*-positiven Salmonellenisolate besonders hoch. Diese hohen Nachweisquoten waren zum einen auf die epidemiologisch dominierende Stellung der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Dublin zurückzuführen, die diese Serovare gerade bei Rindern, Pferden und Geflügel einnehmen. Und zum anderen kommen *spvD*-positive Stämme gerade bei diesen Serovaren besonders häufig vor (über 93,5 % der Isolate). Die hohe Quote *spv*-positiver Isolate bei Typhimurium, Enteritidis und Dublin ist auch aus Untersuchungen in anderen Ländern bekannt (4, 35, 54, 58, 86, 135, 276, 278, 308, 318). In der vorliegenden Untersuchung war die unterschiedliche Häufigkeit dieser Serovare bei den Tierarten daher auch für die tierartigen Unterschiede in der Prävalenz der *spvD*-positiven Salmonellen verantwortlich. Die für die jeweilige Wirtsspezies im einzelnen ermittelten Häufigkeitsanteile der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Dublin stimmten recht gut mit den Daten überein, die durch Umfragen des BgVV bei den veterinärmedizinischen Untersuchungsstellen für ganz Deutschland erhoben wurden (12, 116). Es erscheint daher zulässig, die hier ermittelten Daten auf die Gesamtsituation in Deutschland zu übertragen.

Aus experimentellen Untersuchungen an Mäusen, Hühnern und Rindern ist bekannt, daß die Virulenzplasmide bzw. die Spv-Proteine essentiell sind, damit es nach oraler Aufnahme von Salmonellen zu einer generalisierten Infektion mit langfristiger Besiedelung von extraintestinalem Gewebe des Wirtsorganismus kommt (16, 97, 169). Vermutungen über eine ähnliche Bedeutung bei Infektionen von Schweinen und Menschen leiten sich von der Beobachtung ab, daß *Salmonella*-Isolate aus extraintestinales Probenmaterial signifikant häufiger *spv*-Gene aufwiesen als Isolate aus Fäzesproben (86, 195). Im gleichen Sinne stimmt die hohe Prävalenz des *spv*-Locus bei den Serovaren Typhimurium und Enteritidis gut mit der Beobachtung am hiesigen Sektionsmaterial überein, daß es sich bei *Salmonella*-Isolaten aus extraintestinales Probenmaterial von der Katze vorwiegend um Vertreter der Serovare Typhimurium und Enteritidis handelte und in Fällen von *Salmonella*-Septikämie bei Igeln fast immer um Stämme des Serovars Enteritidis (310). Bei den in der vorliegenden Arbeit geprüften *Salmonella*-Isolaten und auch bei den von **CHIU ET AL.** (53-55) untersuchten Isolaten von Menschen ließ sich eine Korrelation zwischen Herkunft und *spv*-Genotyp statistisch allerdings nicht sichern. Offensichtlich ist die Häufigkeitsverteilung der *spv*-positiven Salmonellen zwi-

schen intestinalem und extraintestinalem Probenmaterial als Parameter nicht zuverlässig genug, um die Rolle der *spv*-Gene bei weiteren Wirtsspezies bewerten zu können.

### Strukturvariabilität von SpvD

Eine wichtige Eigenschaft eines zur serologischen Diagnostik einer Infektionskrankheit gut geeigneten Proteinantigens ist eine möglichst geringe Strukturvielfalt und eine damit geringe Antigenvariabilität. Bis zu dem Zeitpunkt, an dem die vorliegende Dissertation begonnen wurde, waren die *spvD*-Nukleotidsequenzen von nur zwei *Salmonella*-Stämmen veröffentlicht. Diese Sequenzen waren identisch (**102, 154**). Im Jahr 2001 wurde eine weitere, in zwei Nukleotiden abweichende, *spvD*-Nukleotidsequenz veröffentlicht (**113**). Bei den Stämmen handelte es sich um **(a)** den *S. Typhimurium* Stamm SR-11, der als Xylose-fermentierende Spontanmutante aus einer virulenten Mackenzie's BA<sub>2</sub>-Kultur stammte (**253**), **(b)** den Nikotinamid-auxotrophen *S. Dublin*-Stamm LANE aus dem Blut eines Menschen in San Diego, Californien, USA (**32**), sowie **(c)** den *S. Choleraesuis* Stamm RF-1, der 1976 aus dem Blut eines Schweines in Osaka, Japan, isoliert worden war (**146, 213**). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die *spvD*-Gene von 17 weiteren *Salmonella-enterica*-Stämmen sequenziert und miteinander verglichen.

Beim paarweisen Vergleich stimmten die Nukleotidsequenzen der vollständig vorhandenen *spvD*-Gene zu mindestens 98,8 % und die daraus abgeleiteten SpvD-Aminosäuresequenzen zu mindestens 97,7 % überein. Alle untersuchten Stämme der Serovare Dublin und Typhimurium kodierten sogar für ein und dieselbe SpvD-Primärstruktur. Nach diesen Ergebnissen ist die Variationsbreite der SpvD-Primärstruktur ähnlich gering wie diejenige von anderen Spv-Proteinen (Homologie der Varianten von SpvR  $\geq 99,3$  %, SpvA  $\geq 99,2$  %, SpvB  $\geq 94,3$  % und SpvC  $\geq 98,7$  %). Dies ist um so mehr bemerkenswert, als bei der hier durchgeführten Analyse der SpvD-Variabilität wesentlich mehr Stämme berücksichtigt wurden als für die oben zitierten Daten der anderen Spv-Proteine. Im Vergleich zu anderen Virulenzproteinen von Salmonellen sind die Spv-Proteine in ihrer Struktur wesentlich stärker konserviert. So weisen die von Salmonellen chromosomal kodierten Invasionsproteine SpaO und SpaM eine Homologie von 88,5 % bzw. 89,3 % auf (**168**). Und sogar die Strukturuntereinheiten GapA und AceK der hochkonservierten "House-Keeping"-Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Isocitrat-Dehydrogenase sind bei Salmonellen mit 95,8 % bzw. 93,8 % homologen Aminosäuresequenzen sogar geringfügig variantenreicher als SpvD (**197, 198**). Die geringe Strukturvariabilität des *spv*-Locus könnte dadurch begründet sein, daß es sich um einen DNS-Abschnitt handelt, der per Gentransfer im Laufe der Evolution erst relativ spät erworbenen wurde. Für die Hypothese des horizontalen Gentransfers spricht unter anderem auch der molekulare [G+C]-Gehalt im *spv*-Locus, der mit 46 % deutlich geringer ist

als der des übrigen Virulenzplasmids und der des *Salmonella*-Chromosoms (jeweils 53 %) (**102, 113, 186, 255**). Einen weiteren Hinweis, daß der Erwerb und Einbau des *spv*-Locus zeitlich noch nicht sehr lange zurückliegen kann, geben die nur geringen Sequenzunterschiede in den intergenischen Abschnitten des *spv*-Locus (maximale Differenz 0,24 %; [**102**]), die ja einem geringeren Selektionsdruck unterliegen dürften und daher eigentlich variabler sein müßten.

Inwieweit die Aminosäuresubstitutionen in der SpvD-Primärstruktur dessen antigenen Eigenschaften beeinflußt, läßt sich zur Zeit nur schwer abschätzen, da über die Lage bzw. Struktur von Epitopen nichts bekannt ist. Bei anderen bakteriellen Proteinantigenen gibt es einerseits Hinweise, daß schon wenige Aminosäuresubstitutionen zu Proteinvarianten führen, die sich serologisch differenzieren lassen. So vermuten **VANEGAS & JOYS**, daß die serologischen Unterschiede zwischen den Flagellinantigenen [1,2], [1,5], [1,6] und [1,7] von Salmonellen durch die Substitution von nur drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren in der hypervariablen Region IV des Flagellins FljB determiniert werden. Die Aminosäurenkombination in dieser Region beeinflußt die Tertiärstruktur des Flagellins dramatisch, so die Hypothese, und erzeugt ein für das jeweilige Antigen spezifisches diskontinuierliches Epitop (**305**). Andererseits sind gerade Flagelline von Salmonellen auch ein Beispiel dafür, daß zwei Proteine serologisch identisch reagieren, selbst wenn sie sich in mehreren Aminosäuren voneinander unterscheiden. So differieren die Phase-1-Flagelline der Serovare Newmexico und 45:g,z<sub>51</sub>:- in insgesamt 21 von 521 Aminosäuren voneinander, werden aber dennoch von dem gleichen, monospezifischen Testserum erkannt (**167**). Da die in der SpvD-Sequenz gefundenen Aminosäuresubstitutionen nicht unmittelbar aufeinanderfolgten und sich die entdeckten SpvD-Varianten auch nur in maximal vier Aminosäuren voneinander unterschieden, kann man vermuten, daß sie serologisch in hohem Maße kreuzreagieren. Gestützt wird diese These durch serologische Untersuchungsergebnisse mit SpvC, dessen Primärstruktur ebenfalls nur geringfügig variiert. So reagierte ein Hyperimmunserum gegen rekombinantes SpvC von *S. Typhimurium* auch mit entsprechenden Produkten der Serovare Choleraesuis, Dublin, Enteritidis und Gallinarum/Pullorum (**25**).

Aber trotz der insgesamt recht geringen Strukturvariabilität des SpvD-Proteins kommen offensichtlich auch *Salmonella*-Stämme vor, die entweder nur ein SpvD-Fragment synthetisieren, oder die trotz vorhandenem *spv*-Locus kein SpvD-Protein bilden können. So führte die Substitution eines Nukleotides an Position 219 bei dem *S. Gallinarum* Stamm Ti 184/64 zur Bildung eines Stopcodons, weshalb dieser Stamm nur die 72 N-terminalen Aminosäuren von SpvD exprimieren kann. Der Lebendimpf-Stamm 9R Nobilis sowie sein Elternstamm SG 9 besitzen zwar das serovartypische Virulenzplasmid und auch die Gene *spvR*, *spvA*,

*spvB* und *spvC*. Aber offensichtlich haben die Stämme das *spvD*-Gen durch eine Deletion des gesamten Leserahmens verloren, wie die Ergebnisse der Hybridisierung und Sequenzierung zeigten (27). Die Bedeutung der isolierten Deletion von *spvD* bzw. der Expression eines SpvD-Fragments für die Virulenz der Salmonellen ist noch nicht klar. Der Nachweis von SpvC in den Keimlysaten der Stämme 9R Nobilis und SG 9 zeigt, daß die *spvD*-Deletion die Transkription und Translation der übrigen Spv-Proteine zumindest nicht vollständig unterbinden kann (25). Andererseits besitzt der Stamm 9R Nobilis nur geringe Virulenz und wird deshalb schon seit Jahrzehnten kommerziell als *Salmonella*-Lebendimpfstoff für Hühner genutzt (263). Über die Virulenz des sogenannten Elternstammes SG 9 liegen keine verlässlichen Angaben vor. Da außerdem noch ungeklärt ist, welcher molekulare Mechanismus der Attenuierung von Stamm 9R Nobilis zugrunde liegt, bietet sich die *spvD*-Deletion als begründete Hypothese für zukünftige Forschungsarbeiten an. Auch die Frage nach der Häufigkeit mit der *spvD*-deletierte bzw. SpvD-defekte Stämme im Feld zirkulieren, kann derzeit noch nicht beantwortet werden. Bemerkenswert ist aber, daß solche Stämme ausschließlich bei einigen wenigen Vertretern des Serovars Gallinarum/Pullorum sowie des Serovars Arizona gefunden wurden (171).

### Rekombinante Herstellung von rSpvD-His

Nach den Erfahrungen anderer Untersucher werden die fünf Spv-Proteine von Salmonellen unter Laborbedingungen nur in sehr geringen Mengen gebildet (282, 298). Im Falle von SpvD wird außerdem auch noch von einer sehr schnellen Degradation des Proteins berichtet, was aufwendige und teure Maßnahmen erforderlich machte, um SpvD im Westernblot darstellen zu können (78). Es erschien daher von vornherein aussichtslos, SpvD durch Isolierung aus *Salmonella*-Kulturen zu gewinnen. Um dennoch über ausreichende Mengen an möglichst reinem SpvD-Protein für die immunologischen Untersuchungen verfügen zu können, wurde versucht, SpvD als rekombinantes Genprodukt in *E.coli* K12 zu exprimieren. Für die gentechnische Herstellung wurde der Plasmidvektor pET24(b)+ ausgewählt, weil er durch einen T7/*lac*-Promotor und *lac*-Repressor eine stringente Transkriptionskontrolle ermöglichte, so daß sich eine etwaige Toxizität des rekombinanten Genproduktes zunächst nicht negativ auf die Klonierung auswirken würde (269). Ein weiteres Kriterium war, daß das rekombinante SpvD-Protein durch die nukleotidgenaue Rekombination des SpvD-kodierenden DNS-Abschnitts an seinem C-Terminus mit einem sog. "His-Tag" markiert sein sollte. Dieser Schritt sollte es ermöglichen, das Toxin später leichter und in größeren Mengen aus Bakterienzellysat zu isolieren und aufzureinigen.

Wie die verschiedenen Kontrolluntersuchungen zeigten, war die eingeschlagene Klonierungs- und Expressionstrategie sehr erfolgreich. So gelang es, einen rekombinanten *E.coli*-

Klon zu etablieren, der auf die Stimulation durch IPTG mit der Bildung des gewünschten, Histidin-markierten SpvD-Proteins reagierte. Die Identität des Genproduktes wurde dabei mittels einer Nukleotidsequenzanalyse des Expressionsvektors belegt. Phänotypische Belege für die Richtigkeit des Leserasters lieferten **(a)** der Nachweis des C-terminalen His-Tags, der mit einem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat in der Immunoblot-Technik geführt wurde, und **(b)** die molekulare Masse des Histidin-markierten Produktes, die der rechnerisch prognostizierten Masse des rSpvD-His entsprach. Dank der gentechnischen Histidin-Markierung ließ sich das rekombinante SpvD dann auch in hochgradig reiner Form aus den *E.coli*-Bakterienzellysaten gewinnen. Dabei ist es als glücklicher Umstand zu werten, daß das rSpvD-His in der *E.coli*-Zelle überwiegend in löslicher Form vorlag, denn dadurch erübrigten sich aufwendige Arbeitsschritte zu seiner Solubilisierung. Offensichtlich sind Spv-Proteine hochgradig lösliche Proteine, die ihre vorzügliche Löslichkeit auch bei der gentechnischen Fusion mit kurzen Peptiden beibehalten. Die Ausbeute an affinitätschromatographisch aufgereinigtem rekombinantem SpvD-Protein lag bei durchschnittlich 7,6 mg/Liter *E.coli*-Bouillonkultur. Dies entsprach den Mengen von 6 bis 10 mg Protein/Liter, die in ähnlichen Versuchen mit anderen rekombinant in *E.coli*-exprimierten, Histidin-markierten Fusionsproteinen von Salmonellen erzielt worden waren (**25, 260**). Eine kritische Analyse der SDS-PA-Gele offenbarte allerdings, daß selbst das chromatografisch gereinigte rSpvD-His-Produkt noch Spuren anderer Substanzen enthielt. Eine unvollständige Aufreinigung Histidin-markierter Fusionsproteine ist auch von anderen Autoren beobachtet worden, die derartige Expressions- bzw. Aufreinigungssystem verwendet haben (**25, 92**). Immerhin konnte für das rSpvD-His-Produkt weitestgehend ausgeschlossen werden, daß es durch bakterielle Produkte kontaminiert wurde, die eine ähnliche Molekülmasse wie rSpvD-His besaßen und infolge ihrer Ni<sup>2+</sup>-Affinität an die Säulenmatrix banden und zusammen mit rSpvD-His eluiert wurden. Eine derartige Kontamination ist zum Beispiel bei der rekombinanten Herstellung der Adenylatcyclase-1-Domäne IC1 beschrieben worden. IC1 konnte über eine Mg<sup>2+</sup>-Matrix nicht von der *E.coli*-Rotamase SlyD isoliert werden, da dieses 27 kDa-Protein infolge eines ATP-Moleküls ebenfalls die Fähigkeit besaß, an bivalente Ionen zu binden (**194**). Für das rSpvD-His-Produkt schien diese Kontaminante jedoch keine Rolle zu spielen, denn das verwendete Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat band im Westernblot nicht an verdächtige 27 kDa-Produkte in den Kontrollen, bei denen es sich um Keimlysate der *spvD*-negativen *E.coli*-Vektorstämme handelte. Um aber allen Zweifeln an der Spezifität von serologischen Reaktionen, die mit rSpvD-His später erzielt wurden, von vornherein zu begegnen, wurde das affinitätschromatografisch gereinigte Protein mittels einer präparativen SDS-PAGE-Technik weiter aufgereinigt. Hierdurch gelang es Kontaminanten mit einer molekularen Masse von ca. 61 und 69 kDa zu entfernen und das rSpvD-His in hochreiner Form darzustellen.

### Antigenität und Immunogenität von rSpvD-His

Für ein geeignetes Testantigen zur indirekten *Salmonella*-Infektionsdiagnostik ist es essentiell, daß die Salmonelleninfektion den Wirtsorganismus tatsächlich auch zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen dieses Antigen provoziert. Da sich bisher nur eine einzige Arbeit mit der Frage einer humoralen Immunantwort gegen Spv-Proteine beschäftigt hat (**25**), wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Ansätze gewählt, um SpvD auf diese Eigenschaften zu untersuchen: **(a)** ein Immunisierungsversuch am Kaninchen, **(b)** eine experimentelle Infektion von BALB/c-Mäusen sowie **(c)** eine vergleichende serologische Untersuchung von salmonelleninfizierten und -negativen Pferden.

In dem Immunisierungsversuch am Kaninchen konnte zunächst belegt werden, daß das rekombinant hergestellte rSpvD-His immunogen war und nach wiederholter subkutaner Verabreichung zur IgG-Serokonversion gegen dieses Antigen führte. Dieser Befund entspricht den Resultaten anderer Untersucher, die spezifische Hyperimmunseren gegen die rekombinant hergestellten Spv-Proteine SpvA, SpvB, SpvC und auch SpvD in Kaninchen erzeugen konnten (**25, 78, 299**). Ob die beim Kaninchen induzierten IgG-Antikörper SpvD-neutralisierende Eigenschaften besaßen, konnte bisher leider nicht untersucht werden, da die spezifische Funktion dieses Virulenzfaktors noch unbekannt ist, und ein geeignetes Testsystem daher nicht verfügbar ist.

Die experimentelle Salmonelleninfektion der Mäuse führte zu einer meßbaren humoralen Immunantwort gegen SpvD. Zwar war die Zahl der seropositiven Reagenten gegen SpvD nur gering, nämlich nur zwei von insgesamt 27 infizierten Mäusen, aber auch mit dem an sich bewährten LPS-Antigen konnte nur bei denselben zwei Tieren ein serologisch positives Ergebnis erzielt werden. Mit autologem Bakterienzellysate reagierten dieselben beiden Tiere und nur sechs weitere Mäuse seropositiv. Der Befund, daß bei so vielen infizierten Mäusen eine Immunantwort ausblieb, dürfte aber nur zum geringeren Teil das Ergebnis mangelnder Qualität der getesteten Antigene sein und zum größeren Teil ein inhärentes Problem des verwendeten Mausinfektionsmodells. Denn bei genauerer Analyse fiel auf, daß die Ausbildung einer Immunantwort an die zwei einander entgegengesetzten Voraussetzungen geknüpft war, einerseits möglichst lange zu überleben und andererseits möglichst schwer zu erkranken. So verstarben 13 der 27 infizierten Mäuse bereits in den ersten 8 Tagen nach der Infektion; keines dieser Tiere reagierte serologisch mit dem SpvD- oder LPS-Antigen, und nur zwei der insgesamt acht BZL-positiven Tiere gehörten zu dieser Gruppe. Offensichtlich reichte der Zeitraum zwischen Inokulation der Erreger und Entnahme der Blutproben (zeitgleich mit dem Todeszeitpunkt) für eine Serokonversion nicht aus. Nach den Ergebnissen anderer Untersucher sind nach oraler Infektion mit *S. Typhimurium*-Keimen spezifische

Serum-Immunglobuline der Klassen M (**188, 277**) und G (**140**) bei Mäusen erst ab dem 10. Tag nach der Inokulation nachweisbar. Bei der Verwendung attenuierter *Salmonella*-Stämme dauert es sogar mindestens 21 Tage, bis erhöhte Antikörpertiter gemessen werden (**41**). Und auch bei Hühnern, Schweinen und Rindern ist bei experimenteller oraler Infektion mit verschiedenen *S. enterica*-Serovaren frühestens nach ein bis zwei Wochen mit einem Anstieg der spezifischen Antikörpertiter zu rechnen (**20, 65, 118, 163, 173, 201, 319**). Für die Bewertung des SpvD-Antigens ist es problematischer, daß es im Mausmodell überhaupt nur dann zur Induktion von Antikörpern kam, wenn die Tiere erkrankten. So waren Symptome der Salmonellose bei den beiden SpvD- und LPS-reaktiven Mäuse sowie bei sieben von acht BLZ-Reagenten zu beobachten und bei ihnen hinsichtlich des Schweregrades als wenigstens mittelgradig einzustufen. Die Schwere der Erkrankung war dabei offenbar Ausdruck der Effizienz, mit der die Salmonellen den Wirtsorganismus systemisch infizierten. Denn Salmonellen waren bei serologisch positiven Mäusen in Leber und Milz stets nachweisbar und das Milz- und das Lebergewicht waren signifikant positiv mit der Höhe der Antikörpertiter korreliert. Möglicherweise eliminieren Mäuse geringe Erregerzahlen mit Hilfe unspezifischer Abwehrmechanismen in so kurzer Zeit, daß nicht nur die Erkrankung, sondern auch Reize für eine systemisch nachweisbare Immunantwort ausbleiben. Und andererseits stellen möglicherweise schon geringfügig größere Erregerzahlen eine Belastung dar, die zwar eher zu einer humoralen Immunantwort führt, dafür aber auch das Abwehrsystem häufiger überfordert. Ob sich dieses Reaktionsmuster von BALB/c-Mäusen auch auf Salmonelleninfektionen bei den verschiedenen Haustierarten übertragen läßt, muß bezweifelt werden. Denn umfangreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß Rinder, Hühner und Schweine auf Infektionen mit *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Dublin* so regelmäßig mit der Bildung von Antikörpern gegen LPS, Flagellin-, Äußere-Membran-Protein- und andere, nicht näher charakterisierte Antigene reagieren, daß diese als Indikator zur serologischen Diagnostik eingesetzt wurden (**65, 118, 132, 173, 201, 231, 232, 249, 319**). Bei den durch *S. Gallinarum*/*Pullorum* verursachten Erkrankungen des Wirtschaftsgeflügels (Geflügeltyphus, Pullorumseuche) leistete die Validität serologischer Diagnostikverfahren sogar den entscheidenden Beitrag zum Erfolg der Bekämpfung (**21, 85**). Allerdings besitzen die genannten Antigene oftmals auch viele unspezifischen Epitope, so daß auch Infektionen mit anderen Bakterien durch Kreuzreaktionen zu positiven serologischen Befunden führen können (**203**).

Nachdem das Experiment an den BALB/C-Mäusen zwar ergeben hatte, daß infizierte Tiere genauso häufig Antikörper gegen SpvD bilden, wie gegen homologes LPS, aber diese Immunreaktion an die klinische Manifestation der Infektion gebunden und daher selten war, wurde versucht, der Frage nach der Immunogenität von SpvD bei einer relevanten Haustierspezies nachzugehen. Dabei wurde aus mehreren Gründen das Pferd als Modell gewählt.

Zum einen, weil *Salmonella*-Infektionen bei dieser Spezies in Deutschland häufig vorkommen und nicht selten auch zu schweren gesundheitlichen Problemen und sogar zu Todesfällen führen (**33, 84, 142, 254**). Und zum anderen deswegen, weil bei Pferden ein hoher Prozentsatz der Salmonelleninfektionen durch *spv*-positive Stämme von *S. Typhimurium* verursacht wird (**24, 84, 142**), so daß hier am ehesten mit einer Immunreaktion gegen SpvD zu rechnen war. Außerdem standen bereits Serumproben von Pferden zur Verfügung, die in früheren Untersuchungen über die antigenen Eigenschaften von LPS und SpvC verwendet worden waren (**25, 142**).

Mit dem ELISA, in dem das rekombinante SpvD als Fangantigen diente, konnten SpvD-spezifische IgG-Antikörper tatsächlich bei den meisten *Salmonella*-infizierten Pferden und auch bei einigen *Salmonella*-negativen Pferden nachgewiesen werden. Insgesamt war die Reaktion gegen SpvD den Reaktionen gegen LPS<sub>Tm</sub>-Antigen sehr ähnlich. So korrelierten die im rSpvD-His-ELISA ermittelten Werte hoch signifikant mit den Werten im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA. Ein übereinstimmendes Ergebnis war auch, daß Fohlen bis zu einem Alter von sechs Monaten im Mittel sowohl im rSpvD-His- als auch im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA signifikant niedrigere Titer als ältere Pferde aufwiesen. Das galt sowohl für die bakteriologisch negativen Fohlen als auch für die Fohlen, die *Salmonella*-infiziert waren. Der Befund, daß sich Fohlen und ältere Pferde in ihrer humoralen Immunantwort unterscheiden, stimmt mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein. Dort fiel die Bildung spezifischer Immunglobuline sowohl gegen bakterielle Antigene wie LPS und SpvC, als auch gegen Antigene von Herpesvirus-1 bei Fohlen signifikant schwächer aus als bei adulten Pferden (**25, 185**). Fohlen werden nach gängiger Meinung zwar immunologisch naiv, aber immunkompetent geboren (**225**). Die hier ermittelten Daten unterstützen die These, daß das Immunsystem von Pferden in der frühen Lebensphase noch nicht in der Lage ist, auf bestimmte Antigene mit der gleichen Intensität zu reagieren, wie es das zu einem späteren Zeitpunkt tut (**187**). Bei Kälbern scheint es ein ähnliches Phänomen zu geben, denn in den ersten 12 Lebenswochen induziert eine Infektion mit *S. Dublin* keine Antikörper gegen dessen LPS (**69**). Im Gegensatz zu den Fohlen waren die Kälber in dieser Phase aber bereits in der Lage gegen Proteinantigene zu reagieren (**69**).

Aufgrund der Hinweise, daß Fohlen weniger bzw. seltener Antikörper gegen bakterielle Antigene bilden, wurde der rSpvD-His-ELISA hinsichtlich der diagnostischen Erkennung von *Salmonella*-Ausscheidern dann nur an Pferden evaluiert, die zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme älter als sechs Monate waren. Bei dieser Evaluierung war der ELISA zwar sensitiv und spezifisch, um zwischen *Salmonella*-Ausscheidern und *Salmonella*-negativen Pferde zu differenzieren. Es war aber nicht möglich, einen Cut-Off zu bestimmen, bei dem der Test zu

100 % sensitiv und spezifisch war, da sich die Wertebereiche der beiden Gruppen überschneiden. Der LPS<sub>Tm</sub>-ELISA kam bei den ROC-Analysen auf eine gleich hohe Sensitivität (70,6 %) wie der rSpvD-His-ELISA, war dabei aber spezifischer (85,2 % statt 75,9 %). Da viele Pferde in den beiden Testsystemen gleich reagierten, konnte der kombinierte Einsatz der Tests die Spezifität bei gleichbleibender Sensitivität nur auf 90,2 % steigern.

Letztlich konnten beide ELISA mit diesen Qualitätsparametern für den Einsatz zur Einzeltierdiagnostik bei Pferden nicht überzeugen. Doch sollte zugestanden werden, daß unter den hier gewählten Bedingungen die Qualität der Tests eher erheblich unter- als überschätzt wird. Denn in der durchgeführten Untersuchung wurden Pferde als *Salmonella*-negativ eingestuft, wenn sie laut Vorbericht unverdächtig waren und dreimal mit negativem Ergebnis kulturell-bakteriologisch untersucht worden waren. Diese Vorgehensweise war pragmatisch, gewährleistete bei kritischer Betrachtung allerdings nicht, daß ein serologisch positives Ergebnis tatsächlich „falsch-positiv“ war, und nicht doch das serologische Zeichen einer bestehenden latenten Infektion oder die serologische Narbe einer überwundenen Salmonelleninfektion darstellte und damit eigentlich „richtig-positiv“ war. Die Problematik der kulturell-bakteriologischen Untersuchung bzw. die Problematik der intermittierenden Erregerausscheidung ist salmonelleninfizierten Haustieren ist gut bekannt (**184, 201, 302**). Demgegenüber erscheinen Kreuzreaktionen als Ursache für hohe Titer bei einigen als *Salmonella*-negativ eingestuften Pferden weniger wahrscheinlich, wenn sie auch nicht völlig ausgeschlossen werden können. Für LPS sind solche Kreuzreaktionen bereits beschrieben worden. Denn die komplexen LPS-Moleküle besitzen neben serotyp- und artspezifischen Epitopen auch konservierte Epitope, welche sogar bei Bakterien außerhalb der Familie der Enterobacteriaceae vorkommen (**74, 89**). Diese Strukturverwandtschaft kann zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen LPS-Moleküle anderer Bakterienspezies führen (**203**). Das Protein SpvD wurde bisher aber ausschließlich bei Salmonellen nachgewiesen. Untersuchungen bei anderen Enterobacteriaceae, wie *Escherichia coli* oder *Yersinia* sp., führten stets zu einem negativen Resultat (**151, 312**). Proteine mit homologer Aminosäuresequenz sind bisher ebenfalls nicht entdeckt worden. Außerdem deutet der Befund der vorliegenden Arbeit, daß viele der negativen Pferde sowohl im rSpvD-His-ELISA als auch im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA höhere Titer erzielten, eher auf eine spezifische Immunreaktion als auf eine unspezifische Kreuzreaktion hin.

Für die Bewertung der ELISA ist es schwerwiegender, daß es, ähnlich wie im Mäuseversuch, Salmonellenausscheider gab, bei denen der Titer so niedrig war, daß sie auch beim Anlegen eines niedrigeren Cut-Off serologisch nicht als Ausscheider erkannt worden wären. Als Ursache konnte weitgehend ausgeschlossen werden, daß diese Pferde mit *spvD*-negativen *Salmonella*-Stämmen infiziert waren. Tatsächlich war insgesamt nur ein Pferd von einem sol-

chen Stamm betroffen. Eine weitere Erklärung wäre, daß das *spvD*-Gen bei den übrigen Stämmen zwar vorhanden war, aber nicht oder nicht in ausreichendem Maße exprimiert wurde und daher keinen bzw. keinen hinreichenden immunogenen Reiz darstellte. Diese These ist nicht abwegig, denn für das SpvA-Protein wurden solche Unterschiede in der Expression *in vitro* bereits festgestellt und auf serovarspezifische strukturelle Variationen in dem SpvR-Regulatorprotein zurückgeführt (284). Auch die Transkription des *spvD*-Gens ist SpvR-kontrolliert und könnte somit je nach Serovar unterschiedlich stark sein (97, 98, 264). Darüber hinaus wurde am SpvC-Protein beobachtet, daß die Expression eines *spv*-Gens selbst zwischen Stämmen desselben Serovars variieren kann (25). Da aber einige *Salmonella*-positive Pferde nicht nur im rSpvD-His-ELISA, sondern auch im LPS<sub>Tm</sub>-ELISA niedrige Titer aufwiesen, scheint eine unzureichende SpvD-Expression nicht die Hauptursache für niedrige Titer zu sein. Die wahrscheinlichste Ursache ist, daß sich die infizierten Pferde in der Anfangsphase der Infektion befanden und die Antikörperbildung noch nicht ausreichend stimuliert war. Da es sich bei den Probanden in vielen Fällen um Pferde gehandelt hatte, die als akut erkrankte Patienten in der tierärztlichen Ambulanz vorgestellt worden waren, stand für die vorliegende Untersuchungen nur eine einzige, vermutlich meist in der Frühphase der Infektion gezogene Blutprobe zur Verfügung. Daten über die Länge der Zeitspanne, die nach einer Infektion mit nicht-wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovaren verstreichen muß, bis eine Serokonversion nachweisbar wird, liegen für das bisher Pferd nicht vor. Aus experimentellen Infektionen mit derartigen Serovaren an Nutztieren (Rind, Schwein und Huhn) weiß man, daß diese Zeitspanne individuell sehr verschieden ist und mehrere Wochen oder sogar Monaten in Anspruch nehmen kann (bei Rindern bis 2 Monate [265], bei Schweinen bis 37 Tage [201] und bei Hühnern bis 4 Wochen nach Inokulation [150, 232]). Außerdem scheint ein nicht genauer zu definierender Prozentsatz sogar überhaupt nicht mit der Bildung spezifischer Antikörper auf die Salmonelleninfektion zu reagieren. So konnten NIELSEN ET AL. (1995) beobachten, daß bei einer experimentellen oralen Infektion mit 10<sup>8</sup> KbE *S. Typhimurium*-Keimen eines von insgesamt 37 Schweinen innerhalb der 30 Beobachtungstage keine Antikörper gegen das LPS-Antigen bildete (201). Bei der Überprüfung von 31 Rindern in einem LPS-ELISA nach einem *S. Dublin*-Ausbruch fanden HOORFAR ET AL. (1996) ebenfalls ein Tier, welches über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Monaten serologisch negativ reagierte, bei dem aber post mortem Salmonellen aus der Milz isoliert werden konnten (130). Und nach experimenteller Infektion von 18 Wochen alten Hühnern mit 10<sup>9</sup> KbE *S. Enteritidis* erwiesen sich innerhalb von 6 Wochen sogar nur 7 von 10 Tieren serologisch positiv in dem Fimbrien-(SEF14-)spezifischen ELISA (290). Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse deuten demnach darauf hin, daß fehlende, stark verzögerte oder schwache Immunreaktionen eine Eigenheit der intestinalen Infektionen durch nicht-wirtsadaptierte Salmonellen ist und diese auch beim Pferd vorkommen.

## Schlußfolgerungen

1. SpvD ist ein in seiner Primärstruktur hochgradig konserviertes Protein, dessen Gen mit sehr hoher Prävalenz bei den derzeit bei Haustieren dominierenden *Salmonella*-Serovaren Typhimurium und Enteritidis sowie den Serovaren Abortusequi, Choleraesuis, Dublin und Gallinarum/Pullorum vorkommt.
2. Die geringe Nukleotidsequenzvariabilität des *spvD*-Gens unterstützt die These, daß das gesamte *spv*-Operon entwicklungsgeschichtlich ein vergleichsweise junger DNS-Abschnitt ist, der durch horizontalen Gentransfer in verschiedene Linien des *Salmonella*-Stammbaums gelangt ist. Vermutlich hat dieser Locus zur Evolution von Serovaren beigetragen, die besonders gut an warmblütige Wirbeltierspezies angepaßt sind.
3. Die Variabilität der SpvD-Primärstruktur ist gering und gibt keinen Anhaltspunkt dafür, daß es diagnostisch relevante, typspezifische Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen diese Proteine geben müßte.
4. SpvD ist ein Antigen, gegen das Tiere (Mäuse, Pferde) im Zuge einer oralen Salmonelleninfektion mit der Bildung zirkulierender Immunglobuline reagieren. Ausmaß und Geschwindigkeit dieser Immunantwort unterscheiden sich im Prinzip nicht von der Antwort gegen LPS-Antigen von Salmonellen und sind, zumindest bei Mäusen, mit der Schwere des Infektionsverlaufes (Symptomatik, Erregerbesiedelung von Leber und Milz) positiv korreliert.
5. SpvD bzw. seine rekombinante Variante erscheint aufgrund des besonders häufigen Vorkommens von *spvD*-positiven Salmonellen (über 93 % der Isolate) zum serovarübergreifenden, serologischen Nachweis von *Salmonella*-Infektionen bei Pferden und Rindern besonders gut geeignet.
6. Bei Pferden ab einem Alter von 6 Monaten lassen sich Salmonellenausscheider individuell mit einer Sensitivität von 70,4 % und einer Spezifität von 90,2 % anhand erhöhter Anti-SpvD- und Anti-LPS<sub>Tm</sub>-Antikörpertiter erkennen. Diese Verfahren können daher im Rahmen von Einstellungsuntersuchungen in Kliniken und Gestüten dazu beitragen, aufwendige kulturell-bakteriologische Untersuchungen auf Salmonellen auf die serologisch-positiven Pferde zu beschränken und damit die Akzeptanz von Quarantäne- sowie Kontrollmaßnahmen zu erhöhen. Eine serologische Untersuchung von Fohlen im Alter von bis zu 6 Monaten ist allerdings nicht sinnvoll, da ihr Immunsystem meist noch nicht in der Lage ist, auf eine Salmonelleninfektionen mit der Bildung von spezifischem, zirkulierendem IgG zu reagieren.

7. SpvD bzw. seine rekombinante Variante weist gegenüber LPS-Antigenen den verfahrenstechnischen Vorteil auf, daß es sich als einzelnes Protein, das unabhängig von den Anzuchtbedingungen weitestgehend homogen produziert wird, mit gängigen proteinchemischen Methoden leicht standardisieren läßt. Dagegen ist LPS immer ein variables Gemisch aus Molekülen mit unterschiedlich langen O-Seitenketten, dessen Zusammensetzung nur durch aufwendige Spezialverfahren ermittelt und kaum standardisiert werden kann.
8. Das pET-Expressionssystem ist in hervorragender Weise dazu geeignet, um SpvC und SpvD als Histidin-markierte Fusionsproteine in *E.coli* K12 herzustellen. Beide *Salmonella*-Produkte waren für den *E.coli*-Empfängerstamm nicht toxisch und lagen bereits in den *E.coli*-Bakterienzellen überwiegend löslich vor. Da besondere Arbeitsschritte zur Solubilisierung nicht erforderlich sind, können mit einem vergleichsweise einfachen Affinitätschromatografischen Standardverfahren bis zu ca. 4 mg hochgradig reines rSpvD-His aus jedem Liter Bouillonkultur gewonnen werden.
9. Das Virulenzprotein SpvD bzw. das *spvD*-Gen ist als diagnostischer Marker zur Erkennung von Salmonellen zwar hochgradig spezifisch aber im Vergleich zu anderen genetischen oder phänotypischen Markern (Biochemie, O-Antigene, *invA*, *stn*, *fimA* u.a.) für den diagnostischen Routinebetrieb nicht sensitiv genug, da es nur bei einer kleinen Anzahl von bekannten Salmonellen-Serovaren vorkommt und nicht alle Stämme dieser Serovare tatsächlich Merkmalsträger sind.
10. Der weltweit in *Salmonella*-Lebendimpfstoffen eingesetzte attenuierte *S. Gallinarum*-Stamm 9R ist eine *spvD*-Deletionsmutante. Demnach muß seine im Vergleich zu Feldstämmen geringere Virulenz nicht allein auf den bekannten Defekt in der äußeren Membran (inkomplette O-spezifische Seitenketten der LPS-Moleküle) zurückzuführen sein.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den „*Salmonella* plasmid *virulence*“-Faktor *D* (SpvD) auf seine Eignung zum Testantigen für die serologische Diagnostik zu untersuchen. Im einzelnen sollte ermittelt werden, mit welcher Häufigkeit das *spvD*-Gen bei den gegenwärtig in Deutschland bei Tieren verbreiteten Salmonellen vorkommt, wie stark das SpvD in seiner Primärstruktur innerhalb des Genus *Salmonella* variiert und ob es im Zuge von Salmonelleninfektionen zur Immunreaktion gegen das SpvD-Protein kommt.

*Salmonella-enterica*-Feldisolate (n = 874), die in den Jahren 1990 - 1999 von Tieren in Deutschland isoliert worden waren und die 18 verschiedenen O-Gruppen angehörten, wurden mittels DNS-DNS-Hybridisierung im Dot-Blot- und Southern-Blot-Verfahren auf das *spvD*-Gen untersucht. Das *spvD*-Gen war ausschließlich bei Vertretern von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* nachweisbar, wobei 75 % der untersuchten *S. Gallinarum*/*Pullorum*-Stämme, 93,5 % der *S. Typhimurium*-Isolate, jeweils alle *S. Enteritidis*- und *S. Dublin*-Isolate sowie beide getesteten *Salmonella*-Rauhform-Isolate positiv reagierten. Infolge der tierartlich verschiedenen Serovarspektren waren Salmonellen-Isolate von Säugern häufiger Träger des Gens als Isolate von Vögeln oder Reptilien (Rinder 93,9 %, Pferde 92,9 %, Hund/Katze 58,9 %, andere Säuger 66,7 %, Vögel 33,3 %, Reptilien 4,6 %).

Um die Strukturvariabilität des SpvD-Proteins zu bestimmen, wurden die *spvD*-Gene von 17 *Salmonella*-Feldstämmen sequenziert und in die Aminosäuresequenzen übersetzt. Unter Einbeziehung bereits bekannter *spvD*-Sequenzen konnten insgesamt neun *spvD*-Allele differenziert werden, aus denen sich acht SpvD-Varianten mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz ableiten ließen. Mit Ausnahme des *spvD*-Gens von *S. Gallinarum* Stamm Ti 184/64 waren die Unterschiede insgesamt gering und serovarabhängig. Beim paarweisen Vergleich betrug die Homologie der Nukleotidsequenzen mindestens 98,8 % (ClustalW-Methode) und die Homologie der Aminosäuresequenzen mindestens 97,7 % (Jotun-Hein-Methode). Dabei waren alle Stämme der Serovare Typhimurium und Dublin in der SpvD-Primärstruktur identisch. Im *spvD*-Gen von *S. Gallinarum* Stamm Ti 184/64 war das Codon 73 infolge einer Punktmutation zum Stopcodon mutiert, weshalb dieser Stamm nur für ein N-terminales SpvD-Rudiment kodierte.

Zur Untersuchung der immunogenen Bedeutung von SpvD wurden drei Gruppen von BALB/c-Mäusen zu je neun Tieren oral mit Keimen der Serovare Typhimurium, Enteritidis und Dublin infiziert. Innerhalb der dreiwöchigen Beobachtungsdauer war eine systemische humorale Immunreaktion gegen SpvD und LPS bei zwei (22,2 %) der mit *S. Dublin*-Keimen

infizierten Mäuse nachweisbar. Diese beiden Mäuse sowie sechs weitere Mäuse (29,6 %) aus allen drei Gruppen reagierten auch gegen das jeweilige autologe Bakterienzellysate serologisch positiv. Die ermittelten Immunglobulin-Titer korrelierten signifikant positiv miteinander und mit der Inokulationsdosis, der Dauer der Erkrankung sowie dem Leber- und Milzgewicht zum Zeitpunkt der Euthanasie ( $p \leq 0,039$ ).

Serumproben von 56 *Salmonella*-infizierten Pferden und 71 kulturell-bakteriologisch *Salmonella*-negativen Pferden wurden mittels ELISA auf *Salmonella*-spezifische Antikörper untersucht. Hierbei dienten hochreines rekombinantes SpvD (rSpvD-His) sowie chromatografisch aufgereinigtes LPS von *S. Typhimurium* (LPS<sub>Tm</sub>) als Testantigene. Die ELISA-Qualität (Summenmaximum aus Sensitivität und Spezifität) wurde anhand von „receiver operating characteristic“-Kurven auf Grundlage der kulturell-bakteriologischen Befunde bestimmt. Antikörper gegen rSpvD-His und LPS<sub>Tm</sub> konnten in beiden Pferdegruppen nachgewiesen werden. Dabei korrelierten die beiden Tests in ihren Werten signifikant miteinander ( $p < 0,001$ ). Bei den älteren Pferden (> 6 Monate) besaßen die Salmonellenausscheider unabhängig vom Testantigen im Mittel signifikant höhere Titer als die *Salmonella*-negativen Pferde ( $p < 0,001$ ). In dieser Altersgruppe war der rSpvD-His-ELISA zu 75,9 % spezifisch und zu 70,6 % sensitiv, während der LPS<sub>Tm</sub>-ELISA eine Spezifität von 85,2 % und eine Sensitivität von 70,6 % erzielte. Bei jüngeren Pferden waren die Titer durchwegs niedrig und ein Unterschied zwischen *Salmonella*-Positiven und *Salmonella*-Negativen nicht nachweisbar ( $p > 0,05$ ).

Nach diesen Ergebnissen ist der Virulenzfaktor SpvD ein strukturell hochgradig konserviertes Antigen, das bei den derzeit bei Haustieren zirkulierenden *Salmonella*-Stämmen mit sehr hoher Prävalenz vorkommt. Aufgrund des besonders hohen Anteils *spvD*-positiver Salmonellen bei Pferden und Rindern erscheint rekombinantes SpvD als Testantigen bei diesen Tierarten besonders gut geeignet. Als diagnostischer Marker zur Identifizierung von *Salmonella*-verdächtigen Bakterienisolaten ist das *spvD*-Gen aber im Vergleich zu anderen genetischen Markern nicht sensitiv genug.

## SUMMARY

The present study aims to determine the applicability of the *Salmonella* plasmid virulence factor  $\underline{D}$  (SpvD) as antigen in serological detection tests. Particular areas of investigation were the prevalence of *spvD* in salmonellae circulating currently in animals in Germany, the variations in the primary structure of SpvD, and the presence of a humoral immune response against SpvD during a *Salmonella* infection.

*Salmonella enterica* field isolates (n = 874) isolated between 1990 and 1999 from animals in Germany and belonging to 18 different O antigen groups were tested for the presence of *spvD* by dot blot and southern blot hybridization. The *spvD* gene was detected in isolates of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* only. Thereby, 75 % of the tested *S. Gallinarum*/*Pullorum* isolates, 93.5 % of the *S. Typhimurium* isolates, 100 % of the *S. Dublin* and *S. Enteritidis* isolates, and both *Salmonella enterica* rough isolates were *spvD* positive. Caused by the specific serotype prevalence in the different hosts, salmonellae from mammals possessed the *spvD* gene more often than salmonellae from birds or reptiles (cattle 93.9 %, horses 92.9 %, dogs/cats 58.9 %, other mammals 66.7 %, birds 33.3 %, reptiles 4.6 %).

The *spvD* genes of 17 *Salmonella* field strains were sequenced and translated into their primary structures to assess the antigenetic polymorphism of SpvD. Including already published *spvD* sequences nine *spvD* alleles were identified, resulting in eight SpvD variants. With the sole exception of the *S. Gallinarum* strain Ti 184/64, the SpvD variants possessed only minor differences that were serotype specific. The pairwise alignment showed a nucleotide sequence homology of  $\geq 98.8$  % (ClustalW method) and an amino acid sequence homology of  $\geq 97.7$  % (Jotun Hein method). All strains of serotypes Typhimurium and Dublin had identical SpvD primary structures. Due to a single nucleotide substitution in the *spvD* gene of *S. Gallinarum* strain Ti 184/64 at codon 73, a translation stop codon was introduced, so that the gene encoded the 72 amino-terminal amino acids of SpvD only.

Three groups of 9 BALB/c mice were orally inoculated with bacteria of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* or *S. Dublin*, respectively. Within 3 weeks a systemic humoral immune response against SpvD and LPS was detectable in 2 (22.2 %) of the *S. Dublin* inoculated mice. These 2 as well as additional 6 mice (29.6 %) of all three groups reacted serologically positive against autologous bacterial cell lysate. A significant positive correlation was found between results of the ELISAs, as well as between the titers and the inoculation dose, the duration of illness, and the weight of liver and spleen ( $p < 0.039$ ).

Serum samples from 56 *Salmonella* positive horses and 71 bacterial culture negative horses were tested by ELISA for *Salmonella* specific antibodies. Highly pure recombinant SpvD (rSpvD-His) and chromatographically purified LPS from *S. Typhimurium* (LPS<sub>Tm</sub>) served as test antigens. The ELISA quality (maximum score of summarized sensitivity and specificity) was determined with regard to the cultural isolation of *Salmonella* by receiver-operating-characteristic curves. In both groups of horses antibodies against rSpvD-His and LPS<sub>Tm</sub> were detectable. The values of the two ELISAs correlated strongly positive ( $p < 0.001$ ). Of those horses older than six month, the *Salmonella* positive horses revealed a higher mean titer than the *Salmonella* negative horses ( $p < 0.001$ ). In this age group of horses the rSpvD-His-ELISA was 75.9 % specific and 70.6 % sensitive, while the LPS<sub>Tm</sub>-ELISA revealed 85.2 % specificity and 70.6 % sensitivity. The titers in younger horses were lower throughout and no difference was detectable between *Salmonella* positive and negative animals ( $p > 0.05$ ).

The virulence factor SpvD is a highly conserved antigen with a high prevalence in current circulating *Salmonella* strains from animals in Germany. The particularly high percentage of *spvD* positive strains in horses and cattle suggests that recombinant SpvD is suitable as a test antigen for these animals. As a diagnostic tool for the precise identification of putative *Salmonella* isolates, however, the *spvD* gene lacks the required sensitivity in comparison to other genetic markers.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Aabo, S., D. J. Brown and J. E. Olsen.** 2000. Virulence characterization of a strain of *Salmonella enterica* subspecies *houten* (subspecies IV) with chromosomal integrated *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. Res. Microbiol. 151(3): 183-189.
2. **Abe, A., H. Matsui, H. Danbara, K. Tanaka, H. Takahashi and K. Kawahara.** 1994. Regulation of *spvR* gene expression of *Salmonella* virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. Mol. Microbiol. 12(5): 779-787.
3. **Abe, A. and K. Kawahara.** 1995. Transcriptional regulation and promoter sequence of the *spvR* gene of virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. FEMS Microbiol. Lett. 129(2-3): 225-230.
4. **Abouzeed, Y. M., H. Hariharan, C. Poppe and F. S. Kibenge.** 2000. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 23(4): 253-266.
5. **Actis, L. A., M. E. Tolmasky and J. H. Crosa.** 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. Front. Biosci. 4: D43-62.
6. **Ahmer, B. M., M. Tran and F. Heffron.** 1999. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. J. Bacteriol. 181(4): 1364-1368.
7. **Akiba, M., T. Sameshima, T. Anzai, R. Wada and M. Nakazawa.** 1999. *Salmonella Abortusequi* strains of equine origin harbor a 95kb plasmid responsible for virulence in mice. Vet. Microbiol. 68(3-4): 265-272.
8. **Aktories, K., G. Schmidt and I. Just.** 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. Biol. Chem. 381(5-6): 421-426.
9. **Anderson, E. S. and H. R. Smith.** 1972. Fertility inhibition in strains of *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 118(1): 79-84.
10. **Anonymous.** 1984. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Tropfplatten-Verfahren. L06.00/19.
11. **Anonymous.** 1998. Impfstoffe und Sera für Tiere. Tierärztliche Umschau 6/98: 1-24.
12. **Anonymous.** 2001. Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für das Jahr 2000. BgVV-Hefte. Berlin: Nationales Referenzlabor für die Epidemiologie von Zoonosen des BgVV.
13. **Anonymous.** 2001. Jahresstatistik 2000: Enteritis infectiosa nach wichtigen Erregern. Epidemiol. Bull. (22): 157.
14. **Bagdasarian, M., M. Hryniewicz and M. Zdzienicka.** 1975. Integrative suppression of a *dnaA* mutation in *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 139(3): 213-231.

15. **Baird, G. D., E. J. Manning and P. W. Jones.** 1985. Evidence for related virulence sequences in plasmids of *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. 131(Pt 7)(2): 1815-1823.
16. **Barrow, P. A., J. M. Simpson, M. A. Lovell and M. M. Binns.** 1987. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. Infect. Immun. 55(2): 388-392.
17. **Barrow, P. A. and M. A. Lovell.** 1988. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*. J. Gen. Microbiol. 134(Pt 8)(2): 2307-2316.
18. **Barrow, P. A. and M. A. Lovell.** 1989. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. Infect. Immun. 57(10): 3136-3141.
19. **Barrow, P. A.** 1992. ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review. Epidemiol. Infect. 109(3): 361-369.
20. **Barrow, P. A.** 1992. Further observations on the serological response to experimental *Salmonella typhimurium* in chickens measured by ELISA. Epidemiol. Infect. 108(2): 231-241.
21. **Barrow, P. A., A. Berchieri, Jr. and O. al-Haddad.** 1992. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum*-*S. pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 36(2): 227-236.
22. **Barrow, P. A., M. B. Huggins and M. A. Lovell.** 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. Infect. Immun. 62(10): 4602-4610.
23. **Barth, M., C. Marschall, A. Muffler, D. Fischer and R. Hengge-Aronis.** 1995. Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177(12): 3455-3464.
24. **Bauerfeind, R., L. H. Wieler, R. Weiß and G. Baljer.** 1992. Vergleichende Plasmidprofilanalyse von *Salmonella typhimurium* var. *Copenhagen*-Stämmen aus einem Salmonellenausbruch bei Klinikpferden. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 105(2): 38-42.
25. **Bauerfeind, R.** 1999. Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des Lipopolysaccharids bei der Immunabwehr und beim Nachweis von *Salmonella enterica*-Infektionen. Habilitationsschrift aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.
26. **Bauerfeind, R., S. Barth, R. Weiss and G. Baljer.** 2001. Sequence polymorphism of the *Salmonella* plasmid virulence factor D (SpvD) in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114(9-10): 404-408.
27. **Bauerfeind, R.** 2002. Persönliche Mitteilung.
28. **Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann and F. Heffron.** 1996. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infect. Immun. 64(1): 61-68.
29. **Bäumler, A. J., R. M. Tsolis and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 64(5): 1862-1865.

30. **Bäumler, A. J.** 1997. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends Microbiol. 5(8): 318-322.
31. **Bäumler, A. J., R. M. Tsolis and F. Heffron.** 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. Adv. Exp. Med. Biol. 412: 149-158.
32. **Beninger, P. R., G. Chikami, K. Tanabe, C. Roudier, J. Fierer and D. G. Guiney.** 1988. Physical and genetic mapping of the *Salmonella dublin* virulence plasmid pSDL2. Relationship to plasmids from other *Salmonella* strains. J. Clin. Invest. 81(5): 1341-1347.
33. **Biesinger, B.** 1983. Ein Beitrag zum Vorkommen latenter *Salmonella*-Infektionen bei Pferden. Vet. Med. Diss. aus der Klinik für Pferdekrankheiten und Innere Chirurgie und dem Institut für Mikrobiologie, Freie Universität Berlin.
34. **Blackburn, M., E. Golubeva, D. Bowen and R. H. ffrench-Constant.** 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*. Appl. Environ. Microbiol. 64(8): 3036-3041.
35. **Bolton, L. F., L. C. Kelley, M. D. Lee, P. J. Fedorka-Cray and J. J. Maurer.** 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microbiol. 37(5): 1348-1351.
36. **Bowen, D., T. A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia and R. H. ffrench-Constant.** 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. Science 280(5372): 2129-2132.
37. **Boyd, E. F., F. S. Wang, P. Beltran, S. A. Plock, K. Nelson and R. K. Selander.** 1993. *Salmonella* reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. J. Gen. Microbiol. 139(Pt 6): 1125-1132.
38. **Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam and R. K. Selander.** 1996. Molecular genetic relationships of the salmonellae. Appl. Environ. Microbiol. 62(3): 804-808.
39. **Boyd, E. F. and D. L. Hartl.** 1998. *Salmonella* virulence plasmid. Modular acquisition of the *spv* virulence region by an F-plasmid in *Salmonella enterica* subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. Genetics 149(3): 1183-1190.
40. **Boyd, E. F.** 2000. Persönliche Mitteilung.
41. **Brennan, F. R., J. J. Oliver and G. D. Baird.** 1994. Differences in the immune responses of mice and sheep to an aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium*. J. Med. Microbiol. 41(1): 20-28.
42. **Brocchi, M., M. G. Covone, E. Palla and C. L. Galeotti.** 1999. Integration of minitransposons for expression of the *Escherichia coli elt* genes at a preferred site in *Salmonella typhimurium* identifies a novel putative fimbrial locus. Arch. Microbiol. 171(2): 122-126.
43. **Brown, D. J., E. J. Threlfall, M. D. Hampton and B. Rowe.** 1993. Molecular characterization of plasmids in *Salmonella enteritidis* phage types. Epidemiol. Infect. 110(2): 209-216.
44. **Buisan, M., J. M. Rodríguez-Peña and R. Rotger.** 1994. Restriction map of the *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and its homology with the plasmid of *Salmonella typhimurium*. Microb. Pathog. 16(2): 165-169.

45. **Bukholm, G. and K. J. Figenschau.** 1988. Invasiveness of enterobacteria related to the presence of high molecular weight plasmids. *APMIS* 96(1): 30-36.
46. **Caldwell, A. L. and P. A. Gulig.** 1991. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid encodes a positive regulator of a plasmid-encoded virulence gene. *J. Bacteriol.* 173(22): 7176-7185.
47. **Calvo, J. M. and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microb. Rev.* 58(3): 466-490.
48. **Cerin, H. and J. Hackett.** 1989. Molecular cloning and analysis of the incompatibility and partition functions of the virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 7(2): 85-99.
49. **Cerquetti, M. C. and M. M. Gherardi.** 2000. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet. Microbiol.* 76(2): 185-192.
50. **Chen, C. Y., N. A. Buchmeier, S. Libby, F. C. Fang, M. Krause and D. G. Guiney.** 1995. Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J. Bacteriol.* 177(18): 5303-5309.
51. **Chen, C. Y., L. Eckmann, S. J. Libby, F. C. Fang, S. Okamoto, M. F. Kagnoff, J. Fierer and D. G. Guiney.** 1996. Expression of *Salmonella typhimurium* *rpoS* and *rpoS*-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 64(11): 4739-4743.
52. **Chikami, G. K., J. Fierer and D. G. Guiney.** 1985. Plasmid-mediated virulence in *Salmonella dublin* demonstrated by use of a Tn5-*oriT* construct. *Infect. Immun.* 50(2): 420-424.
53. **Chiu, C. H., T. Y. Lin and J. T. Ou.** 1999. Prevalence of the virulence plasmids of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from humans and their association with bacteremia. *Microbiol. Immunol.* 43(9): 899-903.
54. **Chiu, C. H., C. Chu and J. T. Ou.** 2000. Lack of evidence of an association between the carriage of virulence plasmid and the bacteremia of *Salmonella typhimurium* in humans. *Microbiol. Immunol.* 44(9): 741-748.
55. **Chiu, C. H., T. Y. Lin and J. T. Ou.** 2000. Age-related differences of nontyphoid *Salmonella* bacteremia in clinical presentation and outcome: association with specific serovars but not necessarily with the virulence plasmids. *Clin. Infect. Dis.* 30(1): 239-241.
56. **Chiu, C. H., T. L. Wu, L. H. Su, C. Chu, J. H. Chia, A. J. Kuo, M. S. Chien and T. Y. Lin.** 2002. The emergence in Taiwan of Fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *N. Engl. J. Med.* 346(6): 413-419.
57. **Chomczynski, P.** 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201(1): 134-139.
58. **Chowdry, N., E. J. Threlfall, B. Rowe and J. Stanley.** 1993. Genotype analysis of faecal and blood isolates of *Salmonella dublin* from humans in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 110(2): 217-225.
59. **Christensen, H., S. Nordentoft and J. E. Olsen.** 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48 Pt 2: 605-610.

60. **Chu, C., S. F. Hong, C. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu and J. T. Ou.** 1999. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars *typhimurium*, *enteritidis*, *choleraesuis*, and *dublin*. *Infect. Immun.* 67(5): 2611-2614.
61. **Cirillo, D. M., E. J. Heffernan, L. Wu, J. Harwood, J. Fierer and D. G. Guiney.** 1996. Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect. Immun.* 64(6): 2019-2023.
62. **Clements, M., S. Eriksson, D. Tezcan-Merdol, J. C. Hinton and M. Rhen.** 2001. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Ann. Med.* 33(3): 178-185.
63. **Collins, F. M. and P. B. Carter.** 1978. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect. Immun.* 21(1): 41-47.
64. **Colombo, M. M., G. Leori, S. Rubino, A. Barbato and P. Cappuccinelli.** 1992. Phenotypic features and molecular characterisation of plasmids in *Salmonella abortusovis*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 725-731.
65. **Cooper, G. L., L. M. Venables, M. J. Woodward and C. E. Hormaeche.** 1994. Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis aroA* live oral vaccine candidate. *Infect. Immun.* 62(11): 4747-4754.
66. **Coynault, C., V. Robbe-Saule, M. Y. Popoff and F. Norel.** 1992. Growth phase and SpvR regulation of transcription of *Salmonella typhimurium spvABC* virulence genes. *Microb. Pathog.* 13(2): 133-143.
67. **Crosa, J. H., D. J. Brenner, W. H. Ewing and S. Falkow.** 1973. Molecular relationships among the Salmonellae. *J. Bacteriol.* 115(1): 307-315.
68. **Czerny, C. P., K. Osterkorn, G. Wittkowski and M. Huber.** 2001. Fleischsaft-ELISA zur Beurteilung der Salmonellen-Inzidenz von Schlachtschweinen in Bayern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 114(1-2): 35-39.
69. **Da Roden, L., B. P. Smith, S. J. Spier and G. W. Dilling.** 1992. Effect of calf age and *Salmonella* bacterin type on ability to produce immunoglobulins directed against *Salmonella* whole cells or lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 53(10): 1895-1899.
70. **Daifuku, R. and G. K. Chikami.** 1991. Tn1725 transposon mutagenesis of 9-18 delta 7, an *EcoRI* deletion derivative of *Salmonella dublin* lane plasmid pSDL2. *Infect. Immun.* 59(12): 4720-4723.
71. **Danbara, H., R. Moriguchi, S. Suzuki, Y. Tamura, M. Kijima, K. Oishi, H. Matsui, A. Abe and M. Nakamura.** 1992. Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strain on pig septicemia. *J. Vet. Med. Sci.* 54(6): 1175-1178.
72. **Danbara, H., K. Kawahara, H. Matsui, A. Abe and K. Komase.** 1997. DNA encoding a part of virulence plasmid isolated from *Salmonella choleraesuis*. New virulence plasmid and base sequence related to same plasmid. GenBank. E03417.
73. **Dao-Thi, M. H., J. Messens, L. Wyns and J. Backmann.** 2000. The thermodynamic stability of the proteins of the *ccd* plasmid addiction system. *J. Mol. Biol.* 299(5): 1373-1386.
74. **De Jongh-Leuvenink, J., A. S. Bouter, J. H. Marcelis, J. Schellekens and J. Verhoef.** 1986. Cross-reactivity of monoclonal antibodies against lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5(2): 148-151.

75. **Dodson, S. V., J. J. Maurer, P. S. Holt and M. D. Lee.** 1999. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.* 43(4): 685-695.
76. **Dowman, J. E. and G. G. Meynell.** 1970. Pleiotropic effects of de-repressed bacterial sex factors on colicinogeny and cell wall structure. *Mol. Gen. Genet.* 109(1): 57-68.
77. **El-Gedaily, A., G. Paesold, C. Y. Chen, D. G. Guiney and M. Krause.** 1997. Plasmid virulence gene expression induced by short-chain fatty acids in *Salmonella dublin*: identification of *rpoS*-dependent and *rpoS*-independent mechanisms. *J. Bacteriol.* 179(4): 1409-1412.
78. **El-Gedaily, A., G. Paesold and M. Krause.** 1997. Expression profile and subcellular location of the plasmid-encoded virulence (Spv) proteins in wild-type *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 65(8): 3406-3411.
79. **Euzéby, J. P.** 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2: 927-930.
80. **Ewing, W. H.** 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York, USA.: Elsevier.
81. **Ezquerro, E., A. P. Burnens, K. Frith, M. Costas and J. Stanley.** 1993. Molecular genotype analysis of *Salmonella bovis*morbificans. *Mol. Cell. Probes* 7(1): 45-54.
82. **Fang, F. C., M. Krause, C. Roudier, J. Fierer and D. G. Guiney.** 1991. Growth regulation of a *Salmonella* plasmid gene essential for virulence. *J. Bacteriol.* 173(21): 6783-6789.
83. **Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood and D. G. Guiney.** 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(24): 11978-11982.
84. **Faulstich, A.** 1987. Untersuchungen zum Vorkommen von Salmonellen bei stationär behandelten Pferden. *Vet. Med. Diss. aus der Klinik für Pferdekrankheiten und innere Chirurgie und dem Institut für Mikrobiologie, Freie Universität Berlin.*
85. **Feberwee, A., T. S. de Vries, E. G. Hartman, J. J. de Wit, A. R. Elbers and W. A. de Jong.** 2001. Vaccination against *Salmonella enteritidis* in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* tests. *Avian Dis.* 45(1): 83-91.
86. **Fierer, J., M. Krause, R. Tauxe and D. Guiney.** 1992. *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J. Inf. Dis.* 166(3): 639-642.
87. **Fierer, J., L. Eckmann, F. Fang, C. Pfeifer, B. B. Finlay and D. Guiney.** 1993. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophages and nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 61(12): 5231-5236.
88. **Foley, J. E., U. Orgad, D. C. Hirsh, A. Poland and N. C. Pedersen.** 1999. Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214(1): 67-70, 43-64.

89. **Freudenberg, M. A. and C. Galanos.** 1990. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int Rev Immunol* 6(4): 207-221.
90. **Friedrich, M. J., N. E. Kinsey, J. Vila and R. J. Kadner.** 1993. Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Mol. Microbiol.* 8(3): 543-558.
91. **Geue, L.** 1991. Molekulare Klonierung und Charakterisierung virulenzplasmid- und gattungsspezifischer *Salmonella*-DNA-Sonden und ihr Einsatz zu Lösung molekular-epizootologischer Fragestellungen. Diss. med. vet. aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchenlehre, Humboldt-Universität zu Berlin.
92. **Grob, P. and D. G. Guiney.** 1996. In vitro binding of the *Salmonella dublin* virulence plasmid regulatory protein SpvR to the promoter regions of *spvA* and *spvR*. *J. Bacteriol.* 178(7): 1813-1820.
93. **Grob, P., D. Kahn and D. G. Guiney.** 1997. Mutational characterization of promoter regions recognized by the *Salmonella dublin* virulence plasmid regulatory protein SpvR. *J. Bacteriol.* 179(17): 5398-5406.
94. **Guerra, B., I. Laconcha, S. M. Soto, M. A. Gonzalez-Hevia and M. C. Mendoza.** 2000. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 190(2): 341-347.
95. **Guilloteau, L. A., T. S. Wallis, A. V. Gautier, S. MacIntyre, D. J. Platt and A. J. Lax.** 1996. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect. Immun.* 64(8): 3385-3393.
96. **Guiney, D. G., F. C. Fang, M. Krause and S. Libby.** 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* 124(1): 1-9.
97. **Guiney, D. G., F. C. Fang, M. Krause, S. Libby, N. A. Buchmeier and J. Fierer.** 1995. Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clin. Infect. Dis.* 21 Suppl 2(9): S146-151.
98. **Guiney, D. G., S. Libby, F. C. Fang, M. Krause and J. Fierer.** 1995. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol.* 3(7): 275-279.
99. **Gulig, P. A. and R. Curtiss, 3rd.** 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 55(12): 2891-2901.
100. **Gulig, P. A. and R. Curtiss, 3rd.** 1988. Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence genes of the 100-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 56(12): 3262-3271.
101. **Gulig, P. A. and V. A. Chiodo.** 1990. Genetic and DNA sequence analysis of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid gene encoding the 28,000-molecular-weight protein. *Infect. Immun.* 58(8): 2651-2658.
102. **Gulig, P. A., A. L. Caldwell and V. A. Chiodo.** 1992. Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* 6(10): 1395-1411.

103. **Gulig, P. A., H. Danbara, D. G. Guiney, A. J. Lax, F. Norel and M. Rhen.** 1993. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* 7(6): 825-830.
104. **Gulig, P. A. and T. J. Doyle.** 1993. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect. Immun.* 61(2): 504-511.
105. **Gulig, P. A., T. J. Doyle, J. A. Hughes and H. Matsui.** 1998. Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 66(6): 2471-2485.
106. **Hacker, J. and J. Heesemann.** 2000. Molekulare Infektionsbiologie. Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
107. **Hackett, J., I. Kotlarski, V. Mathan, K. Francki and D. Rowley.** 1986. The colonization of Peyer's patches by a strain of *Salmonella typhimurium* cured of the cryptic plasmid. *J. Inf. Dis.* 153(6): 1119-1125.
108. **Hackett, J., P. Wyk, P. Reeves and V. Mathan.** 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J. Inf. Dis.* 155(3): 540-549.
109. **Halavatkar, H. and P. A. Barrow.** 1993. The role of a 54-kb plasmid in the virulence of strains of *Salmonella enteritidis* of phage type 4 for chickens and mice. *J. Med. Microbiol.* 38(3): 171-176.
110. **Hampton, M. D., E. J. Threlfall, J. A. Frost, L. R. Ward and B. Rowe.** 1995. *Salmonella typhimurium* DT 193: differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid fingerprint and salmonella plasmid virulence (*spv*) gene probe. *J. Appl. Bacteriol.* 78(4): 402-408.
111. **Han, S., J. A. Craig, C. D. Putnam, N. B. Carozzi and J. A. Tainer.** 1999. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat. Struct. Biol.* 6(10): 932-936.
112. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Microbiol.* 166(4): 557-580.
113. **Haneda, T., N. Okada, N. Nakazawa, T. Kawakami and H. Danbara.** 2001. Complete DNA Sequence and Comparative Analysis of the 50-Kilobase Virulence Plasmid of *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis. *Infect. Immun.* 69(4): 2612-2620.
114. **Hardy, K. G.** 1987. Plasmids: a practical approach - Practical approach series. Oxford, England: IRL Press Limited.
115. **Hartmann, F. A., R. J. Callan, S. M. McGuirk and S. E. West.** 1996. Control of an outbreak of salmonellosis caused by drug-resistant *Salmonella anatum* in horses at a veterinary hospital and measures to prevent future infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209(3): 629-631.
116. **Hartung, M.** 2000. Berichte über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1999. BgVV-Hefte. Berlin: Nationales Referenzlabor für die Epidemiologie von Zoonosen des BgVV.

117. Hasenson, L. B., L. Kaftyreva, V. G. Laszlo, E. Woitenkova and M. Nesterova. 1992. Epidemiological and microbiological data on *Salmonella enteritidis*. *Acta Microbiol. Hung.* 39(1): 31-39.
118. Hassan, J. O., A. P. Mockett, D. Catty and P. A. Barrow. 1991. Infection and reinfection of chickens with *Salmonella typhimurium*: bacteriology and immune responses. *Avian Dis.* 35(4): 809-819.
119. Heffernan, E. J., J. Fierer, G. Chikami and D. Guiney. 1987. Natural history of oral *Salmonella dublin* infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence. *J. Inf. Dis.* 155(6): 1254-1259.
120. Heffernan, E. J., J. Harwood, J. Fierer and D. Guiney. 1992. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* 174(1): 84-91.
121. Hein, J. 1990. Unified approach to alignment and phylogenies. *Methods Enzymol.* 183: 626-645.
122. Heiskanen, P., S. Taira and M. Rhen. 1994. Role of *rpoS* in the regulation of *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 123(1-2): 125-130.
123. Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel and M. J. Mahan. 1997. Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(3): 934-939.
124. Helmuth, R., R. Stephan, C. Bunge, B. Hoog, A. Steinbeck and E. Bulling. 1985. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect. Immun.* 48(1): 175-182.
125. Hengge-Aronis, R. 1996. Regulation of gene expression during entry in stationary phase, in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Microbiology. Neidhardt, F. C., R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, et al. (eds.). p. 1497-1512. Washington, DC, USA: American Society for Microbiology
126. Hinton, M., E. J. Threlfall and B. Rowe. 1990. The invasiveness of different strains of *Salmonella enteritidis* phage type 4 for young chickens. *FEMS Microbiol. Lett.* 58(2): 193-195.
127. Hoertt, B. E., J. Ou, D. J. Kopecko, L. S. Baron and R. L. Warren. 1989. Novel virulence properties of the *Salmonella typhimurium* virulence-associated plasmid: immune suppression and stimulation of splenomegaly. *Plasmid* 21(1): 48-58.
128. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Maryland, USA.: Lippincott Williams & Wilkins.
129. Hoorfar, J. and V. Bitsch. 1995. Evaluation of an O-antigen ELISA for screening cattle herds for *Salmonella typhimurium*. *Vet. Rec.* 137(15): 374-379.
130. Hoorfar, J., A. Wedderkopp and P. Lind. 1996. Comparison between persisting anti-lipopolysaccharide antibodies and culture at postmortem in *Salmonella*-infected cattle herds. *Vet. Microbiol.* 50(1-2): 81-94.

131. **Horiuchi, S., N. Goto, Y. Inagaki and R. Nakaya.** 1991. The 106-kilobase plasmid of *Salmonella braenderup* and the 100-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* are not necessary for the pathogenicity in experimental models. *Microbiol. Immunol.* 35(3): 187-198.
132. **House, J. K., B. P. Smith, G. W. Dilling and L. D. Roden.** 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for serologic detection of *Salmonella dublin* carriers on a large dairy. *Am. J. Vet. Res.* 54(9): 1391-1399.
133. **House, J. K., M. M. Ontiveros, N. M. Blackmer, E. L. Dueger, J. B. Fitchhorn, G. R. McArthur and B. P. Smith.** 2001. Evaluation of an autogenous *Salmonella* bacterin and a modified live *Salmonella* serotype Choleraesuis vaccine on a commercial dairy farm. *Am. J. Vet. Res.* 62(12): 1897-1902.
134. **Hovi, M., S. Sukupolvi, M. F. Edwards and M. Rhen.** 1988. Plasmid-associated virulence of *Salmonella enteritidis*. *Microb. Pathog.* 4(5): 385-391.
135. **Hudson, C. R., C. Quist, M. D. Lee, K. Keyes, S. V. Dodson, C. Morales, S. Sanchez, D. G. White and J. J. Maurer.** 2000. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 38(5): 1860-1865.
136. **Humphries, A. D., S. M. Townsend, R. A. Kingsley, T. L. Nicholson, R. M. Tsolis and A. J. Bäumlner.** 2001. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* 201(2): 121-125.
137. **Hurme, R., E. Namork, E. L. Nurmiäho-Lassila and M. Rhen.** 1994. Intermediate filament-like network formed in vitro by a bacterial coiled coil protein. *J. Biol. Chem.* 269(14): 10675-10682.
138. **Hurme, R., K. D. Berndt, S. J. Normark and M. Rhen.** 1997. A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90(1): 55-64.
139. **Iglewski, B. H. and D. Kabat.** 1975. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(6): 2284-2288.
140. **Ivanoff, B., F. Laval, O. Creach and R. Fontanges.** 1977. [Evolution of mouse intestinal and blood immunoglobulins after oral route vaccination]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 171(2): 380-385.
141. **Jones, G. W., D. K. Rabert, D. M. Svinarich and H. J. Whitfield.** 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect. Immun.* 38(2): 476-486.
142. **Jonigkeit, E.** 1998. Eignung von LPS-spezifischem Serum- und Koproantikörpertitern als Parameter für den Nachweis von *Salmonella*-Infektionen beim Pferd. *Diss. vet. med. aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I, Professur für Innere Krankheiten der Pferde, Justus-Liebig-Universität Gießen.*
143. **Kado, C. I. and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145(3): 1365-1373.
144. **Kawahara, K., Y. Haraguchi, M. Tsuchimoto, N. Terakado and H. Danbara.** 1988. Evidence of correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella choleraesuis* and its virulence. *Microb. Pathog.* 4(2): 155-163.

145. Kawahara, K., T. Hamaoka, S. Suzuki, M. Nakamura, S. Y. Murayama, T. Arai, N. Terakado and H. Danbara. 1989. Lipopolysaccharide alteration mediated by the virulence plasmid of *Salmonella*. *Microb. Pathog.* 7(3): 195-202.
146. Kawahara, K., M. Tsuchimoto, K. Sudo, N. Terakado and H. Danbara. 1990. Identification and mapping of mba regions of the *Salmonella choleraesuis* virulence plasmid pKDSC50 responsible for mouse bacteremia. *Microb. Pathog.* 8(1): 13-21.
147. Korpela, K., M. Ranki, S. Sukupolvi, P. H. Makela and M. Rhen. 1989. Occurrence of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid-specific sequences in different serovars of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 49(1): 49-54.
148. Koski, P., H. Saarilahti, S. Sukupolvi, S. Taira, P. Riikonen, K. Osterlund, R. Hurme and M. Rhen. 1992. A new alpha-helical coiled coil protein encoded by the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *J. Biol. Chem.* 267(17): 12258-12265.
149. Kowarz, L., C. Coynault, V. Robbe-Saule and F. Norel. 1994. The *Salmonella typhimurium* *katF* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J. Bacteriol.* 176(22): 6852-6860.
150. Kramer, J., A. H. Visscher, J. A. Wagenaar, A. G. Boonstra-Blom and S. H. Jeurissen. 2001. Characterization of the innate and adaptive immunity to *Salmonella enteritidis* PT1 infection in four broiler lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79(3-4): 219-233.
151. Krause, M., J. Fierer and D. Guiney. 1990. Homologous DNA sequences on the virulence plasmids of pathogenic *Yersinia* and *Salmonella dublin* lane. *Mol. Microbiol.* 4(6): 905-911.
152. Krause, M. and D. G. Guiney. 1991. Identification of a multimer resolution system involved in stabilization of the *Salmonella dublin* virulence plasmid pSDL2. *J. Bacteriol.* 173(18): 5754-5762.
153. Krause, M., J. Harwood, J. Fierer and D. Guiney. 1991. Genetic analysis of homology between the virulence plasmids of *Salmonella dublin* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect. Immun.* 59(5): 1860-1863.
154. Krause, M., C. Roudier, J. Fierer, J. Harwood and D. Guiney. 1991. Molecular analysis of the virulence locus of the *Salmonella dublin* plasmid pSDL2. *Mol. Microbiol.* 5(2): 307-316.
155. Krause, M., F. C. Fang and D. G. Guiney. 1992. Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella dublin* involves an unusual operon structure. *J. Bacteriol.* 174(13): 4482-4489.
156. Krause, M., F. C. Fang, A. El-Gedaily, S. Libby and D. G. Guiney. 1995. Mutational analysis of SpvR binding to DNA in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence operon. *Plasmid* 34(1): 37-47.
157. La Teana, A., A. Brandi, M. Falconi, R. Spurio, C. L. Pon and C. O. Gualerzi. 1991. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(23): 10907-10911.
158. Lämmlli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259): 680-685.

159. **Lampel, K. A. and D. E. Hanes.** 1993. Nucleotide sequence homology of a 4.0 kilobase pair virulence region of *Salmonella enteritidis* and other Salmonellae. Unpublished sequence. GenBank. M73796.
160. **Lane, D., R. de Feyter, M. Kennedy, S. H. Phua and D. Semon.** 1986. D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res.* 14(24): 9713-9728.
161. **Lax, A. J., G. D. Pullinger, G. D. Baird and C. M. Williamson.** 1990. The virulence plasmid of *Salmonella dublin*: detailed restriction map and analysis by transposon mutagenesis. *J. Gen. Microbiol.* 136(Pt 6)(8): 1117-1123.
162. **Le Minor, L. and M. Y. Popoff.** 1987. Request of an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 465-468.
163. **Lee, G. M., G. D. Jackson and G. N. Cooper.** 1983. Infection and immune responses in chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. *Avian Dis.* 27(3): 577-583.
164. **Lehmann, S., H.-J. Selbitz, K. Hagenau and H. Liebermann.** 1990. Erste Ergebnisse der Bestimmung von Plasmidprofilen veterinär-medizinischer *Salmonella*-Isolate. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 44(2): 319-327.
165. **Lesnick, M. L., N. E. Reiner, J. Fierer and D. G. Guiney.** 2001. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 39(6): 1464-1470.
166. **Lewin, B.** 1998. *Molekularbiologie der Gene.* Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
167. **Li, J., K. Nelson, A. C. McWhorter, T. S. Whittam and R. K. Selander.** 1994. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(7): 2552-2556.
168. **Li, J., H. Ochman, E. A. Groisman, E. F. Boyd, F. Solomon, K. Nelson and R. K. Selander.** 1995. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(16): 7252-7256.
169. **Libby, S. J., L. G. Adams, T. A. Ficht, C. Allen, H. A. Whitford, N. A. Buchmeier, S. Bossie and D. G. Guiney.** 1997. The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* 65(5): 1786-1792.
170. **Libby, S. J., M. Lesnick, P. Hasegawa, E. Weidenhammer and D. G. Guiney.** 2000. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell. Microbiol.* 2(1): 49-58.
171. **Libby, S. J., M. Lesnick, P. Hasegawa, M. Kurth, C. Belcher, J. Fierer and D. G. Guiney.** 2002. Characterization of the *spv* locus in *Salmonella enterica* serovar Arizona. *Infect. Immun.* 70(6): 3290-3294.

172. **Liesegang, A., D. Davos, J. C. Balzer, W. Rabsch, R. Prager, D. Lightfoot, A. Siitonen, H. Claus and H. Tschäpe.** 2002. Phage typing and PFGE pattern analysis as tools for epidemiological surveillance of *Salmonella enterica* serovar Bovismorbificans infections. *Epidemiol. Infect.* 128(2): 119-130.
173. **Lindberg, A. A. and J. A. Robertsson.** 1983. *Salmonella typhimurium* infection in calves: cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines. *Infect. Immun.* 41(2): 751-757.
174. **Maddox, C. W. and W. H. Fales.** 1991. Use of a *Salmonella typhimurium*-derived virulence probe in the detection of *Salmonella* sp. and in the characterization of *S. cholerae-suis* virulence plasmids. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(3): 218-222.
175. **Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker.** 2000. Brock biology of microorganisms. 9th ed. New Jersey, USA.: Prentice-Hall, Inc.
176. **Manning, E. J., G. D. Baird and P. W. Jones.** 1986. The role of plasmid genes in the pathogenicity of *Salmonella dublin*. *J. Med. Microbiol.* 21(3): 239-243.
177. **Maré, L., L. M. Dick and M. L. van der Walt.** 2001. Characterization of south african isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *Int. J. Food Microbiol.* 64(3): 237-245.
178. **Marshall, D. G., B. J. Sheehan and C. J. Dorman.** 1999. A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 34(1): 134-145.
179. **Matsui, H., K. Kawahara, N. Terakado and H. Danbara.** 1990. Nucleotide sequence of a gene encoding a 29 kDa polypeptide in *mba* region of the virulence plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis*. *Nucleic Acids Res.* 18(4): 1055.
180. **Matsui, H., A. Abe, K. Kawahara, N. Terakado and H. Danbara.** 1991. Positive regulator for the expression of Mba protein of the virulence plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis*. *Microb. Pathog.* 10(6): 459-464.
181. **Matsui, H., A. Abe, S. Suzuki, M. Kijima, Y. Tamura, M. Nakamura, K. Kawahara and H. Danbara.** 1993. Molecular mechanism of the regulation of expression of plasmid-encoded mouse bacteremia (*mba*) genes in *Salmonella* serovar *Choleraesuis*. *Mol. Gen. Genet.* 236(2-3): 219-226.
182. **Matsui, H., M. Eguchi and Y. Kikuchi.** 2000. Use of confocal microscopy to detect *Salmonella typhimurium* within host cells associated with Spv-mediated intracellular proliferation. *Microb. Pathog.* 29(1): 53-59.
183. **Matsui, H., C. M. Bacot, W. A. Garlington, T. J. Doyle, S. Roberts and P. A. Gulig.** 2001. Virulence Plasmid-Borne *spvB* and *spvC* Genes Can Replace the 90-Kilobase Plasmid in Conferring Virulence to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Subcutaneously Inoculated Mice. *J. Bacteriol.* 183(15): 4652-4658.
184. **McCain, C. S. and K. C. Powell.** 1990. Asymptomatic salmonellosis in healthy adult horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2(3): 236-237.

185. **McCartan, C. G., M. M. Russell, J. L. Wood and J. A. Mumford.** 1995. Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet. Rec.* 136(1): 7-12.
186. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413(6858): 852-856.
187. **McClure, J. J.** 1990. Failure of passive transfer (FPT), in *Large Animal Internal Medicine*. Smith, P. B. p. 1601-1604. St Louis, USA: Mosby
188. **McSorley, S. J. and M. K. Jenkins.** 2000. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infect. Immun.* 68(6): 3344-3348.
189. **Mecsas, J., R. Welch, J. W. Erickson and C. A. Gross.** 1995. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 177(3): 799-804.
190. **Methner, U., A. Berndt and G. Steinbach.** 2001. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. *Avian Dis.* 45(3): 631-638.
191. **Meyer, H., H. Koch, U. Methner and G. Steinbach.** 1993. Vaccines in salmonellosis control in animals. *Zentralbl. Bakteriologie.* 278(2-3): 407-415.
192. **Michiels, T., M. Y. Popoff, S. Durviaux, C. Coynault and G. Cornelis.** 1987. A new method for the physical and genetic mapping of large plasmids: application to the localisation of the virulence determinants on the 90 kb plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 3(2): 109-116.
193. **Miller, S. I. and J. J. Mekalanos.** 1990. Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J. Bacteriol.* 172(5): 2485-2490.
194. **Mitterauer, T., C. Nanoff, H. Ahorn, M. Freissmuth and M. Hohenegger.** 1999. Metal-dependent nucleotide binding to the *Escherichia coli* rotamase SlyD. *Biochem. J.* 342(Pt 1): 33-39.
195. **Montenegro, M. A., G. Morelli and R. Helmuth.** 1991. Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb. Pathog.* 11(6): 391-397.
196. **Nakamura, M., S. Sato, T. Ohya, S. Suzuki and S. Ikeda.** 1985. Possible relationship of a 36-megadalton *Salmonella enteritidis* plasmid to virulence in mice. *Infect. Immun.* 47(3): 831-833.
197. **Nelson, K., T. S. Whittam and R. K. Selander.** 1991. Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(15): 6667-6671.

198. **Nelson, K., F. S. Wang, E. F. Boyd and R. K. Selander.** 1997. Size and sequence polymorphism in the isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene (*aceK*) and flanking regions in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Genetics* 147(4): 1509-1520.
199. **Nicholson, B. and D. Low.** 2000. DNA methylation-dependent regulation of Pef expression in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 35(4): 728-742.
200. **Nickerson, C. A. and R. Curtiss, 3rd.** 1997. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 65(5): 1814-1823.
201. **Nielsen, B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard and P. Lind.** 1995. The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47(3-4): 205-218.
202. **Nielsen, B., L. Alban, H. Stege, L. L. Sørensen, V. Møgelmoose, J. Bagger, J. Dahl and D. L. Baggesen.** 2001. A new *Salmonella* surveillance and control programme in Danish pig herds and slaughterhouses. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 114(9-10): 323-326.
203. **Nnalue, N. A.** 1999. All accessible epitopes in the *Salmonella* lipopolysaccharide core are associated with branch residues. *Infect. Immun.* 67(2): 998-1003.
204. **Nobuta, K., Y. Ishibashi and T. Arai.** 1999. Cloning and nucleotide sequence of virulence associated gene of *Salmonella enteritidis* 50kbp plasmid. Unpublished Sequence. GenBank. D10073.
205. **Nolan, L. K., C. W. Giddings and J. Brown.** 1995. The distribution of *invA*, *pagC* and *spvC* genes among *Salmonella* isolates from animals. *Vet. Res. Commun.* 19(3): 167-177.
206. **Norel, F., C. Coynault, I. Miras, D. Hermant and M. Y. Popoff.** 1989. Cloning and expression of plasmid DNA sequences involved in *Salmonella* serotype *typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* 3(6): 733-743.
207. **Norel, F., M. R. Pisano, J. Nicoli and M. Y. Popoff.** 1989. Nucleotide sequence of the plasmid-borne virulence gene *mkfA* encoding a 28 kDa polypeptide from *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 140(3): 263-265.
208. **Norel, F., M. R. Pisano, J. Nicoli and M. Y. Popoff.** 1989. A plasmid-borne virulence region (2.8 kb) from *Salmonella typhimurium* contains two open reading frames. *Res. Microbiol.* 140(9): 627-630.
209. **Norel, F., M. R. Pisano, J. Nicoli and M. Y. Popoff.** 1989. Nucleotide sequence of the plasmid-borne virulence gene *mkfB* from *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* 140(7): 455-457.
210. **Norel, F., V. Robbe-Saule, M. Y. Popoff and C. Coynault.** 1992. The putative sigma factor KatF (RpoS) is required for the transcription of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *spvB* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 78(2-3): 271-276.
211. **O'Byrne, C. P. and C. J. Dorman.** 1994. The *spv* virulence operon of *Salmonella typhimurium* LT2 is regulated negatively by the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein system. *J. Bacteriol.* 176(3): 905-912.
212. **O'Byrne, C. P. and C. J. Dorman.** 1994. Transcription of the *Salmonella typhimurium spv* virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol. Lett.* 121(1): 99-105.

213. **Okada, N.** 2001. Persönliche Mitteilung.
214. **Okada, N. and T. Haneda.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis 50k virulence plasmid DNA, complete sequence. Unpublished Sequence. GenBank. AB040415.
215. **Olsen, J. E., D. L. Baggesen, B. B. Nielsen and H. E. Larsen.** 1990. The prevalence of plasmids in Danish bovine and human isolates of *Salmonella dublin*. *APMIS* 98(8): 735-740.
216. **Otto, H., D. Tezcan-Merdol, R. Girisch, F. Haag, M. Rhen and F. Koch-Nolte.** 2000. The *spvB* gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Mol. Microbiol.* 37(5): 1106-1115.
217. **Ou, J. T., L. S. Baron, X. Y. Dai and C. A. Life.** 1990. The virulence plasmids of *Salmonella* serovars *typhimurium*, *choleraesuis*, *dublin*, and *enteritidis*, and the cryptic plasmids of *Salmonella* serovars *copenhagen* and *sendai* belong to the same incompatibility group, but not those of *Salmonella* serovars *durban*, *gallinarum*, *give*, *infantis* and *pullorum*. *Microb. Pathog.* 8(2): 101-107.
218. **Ou, J. T. and L. S. Baron.** 1991. Strain differences in expression of virulence by the 90 kilobase pair virulence plasmid of *Salmonella* serovar Typhimurium. *Microb. Pathog.* 10(3): 247-251.
219. **Ou, J. T.** 1993. The 90 kilobase pair virulence plasmid of *Salmonella* serovar Typhimurium coexists in strains with a plasmid of the 23 incompatibility groups. *Microb. Pathog.* 15(3): 237-242.
220. **Ou, J. T., M. Y. Lin and H. L. Chao.** 1994. Presence of F-like OriT base-pair sequence on the virulence plasmids of *Salmonella* serovars Gallinarum, Enteritidis, and Typhimurium, but absent in those of Choleraesuis and Dublin. *Microb. Pathog.* 17(1): 13-21.
221. **Pardon, P., M. Y. Popoff, C. Coynault, J. Marly and I. Miras.** 1986. Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 137B(1): 47-60.
222. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413(6858): 848-852.
223. **Pascopella, L. and P. L. Small.** 1997. *Salmonella gallinarum* 85 kb plasmid regulatory protein (*spvR*) gene, complete cds. Unpublished sequence. GenBank. AF026953.
224. **Perelle, S., M. Domenighini and M. R. Popoff.** 1996. Evidence that Arg-295, Glu-378, and Glu-380 are active-site residues of the ADP-ribosyltransferase activity of iota toxin. *FEBS Lett.* 395(2-3): 191-194.
225. **Perryman, L. E., T. C. McGuire and R. L. Torbeck.** 1980. Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus. *Am. J. Vet. Res.* 41(8): 1197-1200.
226. **Petrie, L., I. E. Selman, M. Grindlay and H. Thompson.** 1977. Salmonellosis in young calves due to *Salmonella enteritidis*. *Vet. Rec.* 101(20): 398-402.

227. **Platt, D. J., J. Taggart and K. A. Heraghty.** 1988. Molecular divergence of the serotype-specific plasmid (pSLT) among strains of *Salmonella typhimurium* of human and veterinary origin and comparison of pSLT with the serotype specific plasmids of *S. enteritidis* and *S. dublin*. *J. Med. Microbiol.* 27(4): 277-284.
228. **Popoff, M. Y., I. Miras, C. Coynault, C. Lasselin and P. Pardon.** 1984. Molecular relationships between virulence plasmids of *Salmonella* serotypes *typhimurium* and *dublin* and large plasmids of other *Salmonella* serotypes. *Ann. Microbiol. (Paris)* 135A(3): 389-398.
229. **Popoff, M. Y., J. Bockemühl, F. W. Brenner and L. L. Gheesling.** 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 152(10): 907-909.
230. **Poppe, C., R. Curtiss, 3rd, P. A. Gulig and C. L. Gyles.** 1989. Hybridization studies with a DNA probe derived from the virulence region of the 60 Mdal plasmid of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Vet. Res.* 53(4): 378-384.
231. **Proux, K., C. Houdayer, F. Humbert, R. Cariolet, V. Rose, E. Eveno and F. Madec.** 2000. Development of a complete ELISA using *Salmonella* lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Vet. Res.* 31(5): 481-490.
232. **Proux, K., E. Jouy, C. Houdayer, J. Protais, M. Dibb-Füller, E. Boscher, A. Gillard, P. Gracieux, F. Gilbert, C. Beaumont and M. Duchet-Suchaux.** 2002. Reliable ELISAs showing differences between resistant and susceptible lines in hens orally inoculated with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Res.* 33(1): 23-33.
233. **Pullinger, G. D., G. D. Baird, C. M. Williamson and A. J. Lax.** 1989. Nucleotide sequence of a plasmid gene involved in the virulence of salmonellas. *Nucleic Acids Res.* 17(19): 7983.
234. **Pullinger, G. D. and A. J. Lax.** 1992. A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Mol. Microbiol.* 6(12): 1631-1643.
235. **Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Pliikaytis and J. J. Farmer.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27(2): 313-320.
236. **Rhen, M. and S. Sukupolvi.** 1988. The role of the *traT* gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid for serum resistance and growth within liver macrophages. *Microb. Pathog.* 5(4): 275-285.
237. **Rhen, M., M. Virtanen and P. H. Makela.** 1989. Localization by insertion mutagenesis of a virulence-associated region on the *Salmonella typhimurium* 96 kilobase pair plasmid. *Microb. Pathog.* 6(2): 153-158.
238. **Rhen, M., P. Riikonen and S. Taira.** 1993. Expression of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid genes in cultured macrophages. *Infect. Agents Dis.* 2(4): 285-287.
239. **Rice, D. H., T. E. Besser and D. D. Hancock.** 1997. Epidemiology and virulence assessment of *Salmonella dublin*. *Vet. Microbiol.* 56(1-2): 111-124.
240. **Rice, P. A., S. Yang, K. Mizuuchi and H. A. Nash.** 1996. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87(7): 1295-1306.

241. **Rioux, C. R., M. J. Friedrich and R. J. Kadner.** 1990. Genes on the 90-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* confer low-affinity cobalamin transport: relationship to fimbria biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 172(11): 6217-6222.
242. **Robbe-Saule, V., F. Schaeffer, L. Kowarz and F. Norel.** 1997. Relationships between H-NS, sigma S, SpvR and growth phase in the control of *spvR*, the regulatory gene of the *Salmonella* plasmid virulence operon. *Mol. Gen. Genet.* 256(4): 333-347.
243. **Rodríguez-Peña, J. M., I. Alvarez, M. Ibañez and R. Rotger.** 1997. Homologous regions of the *Salmonella enteritidis* virulence plasmid and the chromosome of *Salmonella typhi* encode thiol: disulphide oxidoreductases belonging to the DsbA thioredoxin family. *Microbiology* 143(Pt 4)(5): 1405-1413.
244. **Rodríguez-Peña, J. M., M. Buisan, M. Ibañez and R. Rotger.** 1997. Genetic map of the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis* and nucleotide sequence of its replicons. *Gene* 188(1): 53-61.
245. **Rotger, R. and J. Casadesús.** 1999. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* 2(3): 177-184.
246. **Roudier, C., M. Krause, J. Fierer and D. G. Guiney.** 1990. Correlation between the presence of sequences homologous to the *vir* region of *Salmonella dublin* plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two *Salmonella* serotypes in mice. *Infect. Immun.* 58(5): 1180-1185.
247. **Roudier, C., J. Fierer and D. G. Guiney.** 1992. Characterization of translation termination mutations in the *spv* operon of the *Salmonella* virulence plasmid pSDL2. *J. Bacteriol.* 174(20): 6418-6423.
248. **Rychlik, I., M. A. Lovell and P. A. Barrow.** 1998. The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* and *faeI* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159(2): 255-260.
249. **Sachsenweger, O., J. E. Lohr and J. Kusters.** 1994. Beurteilung von drei kommerziellen ELISA-Testkits zum Nachweis von Antikörpern gegen *Salmonella enteritidis*. *Tierärztl. Prax.* 22(4): 350-357.
250. **Sambrock, J., E. , F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual.* 2 ed.: Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
251. **Sameshima, T., H. Ito, I. Uchida, H. Danbara and N. Terakado.** 1993. A conjugative plasmid pTE195 coding for drug resistance and virulence phenotypes from *Salmonella naestved* strain of calf origin. *Vet. Microbiol.* 36(3-4): 197-203.
252. **Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626.
253. **Schneider, H. A. and N. D. Zinder.** 1956. Nutrition of the host and natural resistance to infection. V. An improved assay employing genetic markers in the double strain inoculation test. *J. Exp. Med.* 103: 207-223.
254. **Schott, H. C., 2nd, S. L. Ewart, R. D. Walker, R. M. Dwyer, S. Dietrich, S. W. Eberhart, J. Kusey, J. A. Stick and F. J. Derksen.** 2001. An outbreak of salmonellosis among horses at a veterinary teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218(7): 1152-1159, 1100.

255. Selander, R. K., J. Li, E. F. Boyd, F. S. Wang and K. Nelson. 1994. DNA sequence analysis of the genetic structure of populations of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, in Bacterial diversity and systematics. Priest, F. G., A. Ramos-Cormenzana and B. J. Tindall. p. 17-49. New York, USA: Plenum Press
256. Selbitz, H.-J., H.-J. Sinell, A. Sziegoleit and J. Kleer. 1995. Das Salmonellen Problem. Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
257. Shannon, K. P., B. G. Spratt and R. J. Rowbury. 1972. Cell division and the production of cells lacking nuclear bodies in a mutant of *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 118(2): 185-197.
258. Sheehan, B. J. and C. J. Dorman. 1998. In vivo analysis of the interactions of the LysR-like regulator SpvR with the operator sequences of the *spvA* and *spvR* virulence genes of *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 30(1): 91-105.
259. Sheehy, R. J., D. P. Allison and R. Curtiss, 3rd. 1973. Cryptic plasmids in a minicell-producing strain of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 114(1): 439-442.
260. Sinclair, J. C., R. Delgoda, M. E. Noble, S. Jarmin, N. K. Goh and E. Sim. 1998. Purification, Characterization, and Crystallization of an *N*-Hydroxyarylamine O-Acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. Protein Expr. Purif. 12(3): 371-380.
261. Sizemore, D. R., P. S. Fink, J. T. Ou, L. Baron, D. J. Kopecko and R. L. Warren. 1991. Tn5 mutagenesis of the *Salmonella typhimurium* 100 kb plasmid: definition of new virulence regions. Microb. Pathog. 10(6): 493-499.
262. Smith, H. R., G. O. Humphreys, N. D. F. Grindley, J. N. Gringley and E. S. Sanderson. 1973. Molecular studies of an *fi+* plasmid from strains of *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 126: 143-151.
263. Smith, H. W. 1956. The use of live vaccines in experimental *Salmonella gallinarum* infection in chickens with observations in their interference effect. J. Hyg. (Lond.) 54: 419-432.
264. Spector, M. P. 1998. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella*. Adv. Microb. Physiol. 40(4): 233-279.
265. Spier, S. J., B. P. Smith, J. W. Tyler, J. S. Cullor, G. W. Dilling and L. Da Pfaff. 1990. Use of ELISA for detection of immunoglobulins G and M that recognize *Salmonella dublin* lipopolysaccharide for prediction of carrier status in cattle. Am. J. Vet. Res. 51(12): 1900-1904.
266. Spink, J. M., G. D. Pullinger, M. W. Wood and A. J. Lax. 1994. Regulation of *spvR*, the positive regulatory gene of *Salmonella* plasmid virulence genes. FEMS Microbiol. Lett. 116(1): 113-121.
267. Spratt, B. G. and R. J. Rowbury. 1973. The plasmid of *Salmonella typhimurium* LT2. Mol. Gen. Genet. 121(4): 347-353.
268. Stackbrandt, E., Murray and Truper. 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the 'Purple Bacteria and their Relatives'. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 321-325.

269. Studier, F. W. and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189(1): 113-130.
270. Sukupolvi, S., D. O'Connor and M. F. Edwards. 1986. The *traT* protein is able to normalize the phenotype of a plasmid-carried permeability mutation of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 132(Pt 8)(2): 2079-2085.
271. Sukupolvi, S. and D. O'Connor. 1987. Amino acid alterations in a hydrophobic region of the TraT protein of R6-5 increase the outer membrane permeability of enteric bacteria. *Mol. Gen. Genet.* 210(1): 178-180.
272. Sukupolvi, S., R. Vuorio, S. Y. Qi, D. O'Connor and M. Rhen. 1990. Characterization of the *traT* gene and mutants that increase outer membrane permeability from the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol. Microbiol.* 4(1): 49-57.
273. Sukupolvi, S., P. Riikonen, S. Taira, H. Saari-Lahti and M. Rhen. 1992. Plasmid-mediated serum resistance in *Salmonella enterica*. *Microb. Pathog.* 12(3): 219-225.
274. Suzuki, S., K. Ohishi, T. Takahashi, Y. Tamura, M. Muramatsu, M. Nakamura and S. Sato. 1992. The role of 36 megadalton plasmid of *Salmonella enteritidis* for the pathogenesis in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 54(5): 845-850.
275. Suzuki, S., K. Komase, H. Matsui, A. Abe, K. Kawahara, Y. Tamura, M. Kijima, H. Danbara, M. Nakamura and S. Sato. 1994. Virulence region of plasmid pNL2001 of *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* 140(Pt 6): 1307-1318.
276. Swamy, S. C., H. M. Barnhart, M. D. Lee and D. W. Dreesen. 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(10): 3768-3771.
277. Sziegoleit, A. 1976. [Secretory immunoglobulins and serum antibodies after oral infection of the white mouse with *Salmonella typhimurium*]. *Z. Immunitätsforsch. Immunobiol.* 152(3): 244-259.
278. Szmolleny, G., A. Kostyak, S. Kovacs, K. Speed, Y. Jones, V. G. Laszlo, I. Gado, J. Paszti, C. Wray and B. Nagy. 2000. Epidemiology and characterization of animal *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *typhimurium* DT104 in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 48(4): 407-420.
279. Taira, S. and M. Rhen. 1989. Identification and genetic analysis of *mkaA* - a gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid necessary for intracellular growth. *Microb. Pathog.* 7(3): 165-173.
280. Taira, S. and M. Rhen. 1989. Molecular organization of genes constituting the virulence determinant on the *Salmonella typhimurium* 96 kilobase pair plasmid. *FEBS Lett.* 257(2): 274-278.
281. Taira, S. and M. Rhen. 1990. Nucleotide sequence of *mkaD*, a virulence-associated gene of *Salmonella typhimurium* containing variable and constant regions. *Gene* 93(1): 147-150.
282. Taira, S., M. Baumann, P. Riikonen, S. Sukupolvi and M. Rhen. 1991. Amino-terminal sequence analysis of four plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 61(2-3): 319-323.

283. Taira, S., P. Riikonen, H. Saarilahti, S. Sukupolvi and M. Rhen. 1991. The *mkaC* virulence gene of the *Salmonella* serovar *typhimurium* 96 kb plasmid encodes a transcriptional activator. *Mol. Gen. Genet.* 228(3): 381-384.
284. Taira, S., P. Heiskanen, R. Hurme, H. Heikkila, P. Riikonen and M. Rhen. 1995. Evidence for functional polymorphism of the *spvR* gene regulating virulence gene expression in *Salmonella*. *Mol. Gen. Genet.* 246(4): 437-444.
285. Terakado, N., T. Sekizaki, K. Hashimoto and S. Naitoh. 1983. Correlation between the presence of a fifty-megadalton plasmid in *Salmonella dublin* and virulence for mice. *Infect. Immun.* 41(1): 443-444.
286. Terakado, N., T. Hamaoka and H. Danbara. 1988. Plasmid-mediated serum resistance and alterations in the composition of lipopolysaccharides in *Salmonella dublin*. *J. Gen. Microbiol.* 134(Pt 7): 2089-2093.
287. Terakado, N., T. Ushijima, T. Samejima, H. Ito, T. Hamaoka, S. Murayama, K. Kawahara and H. Danbara. 1990. Transposon insertion mutagenesis of a genetic region encoding serum resistance in an 80 kb plasmid of *Salmonella dublin*. *J. Gen. Microbiol.* 136(Pt 9)(9): 1833-1838.
288. Tezcan-Merdol, D., T. Nyman, U. Lindberg, F. Haag, F. Koch-Nolte and M. Rhen. 2001. Actin is ADP-ribosylated by the *Salmonella enterica* virulence-associated protein SpvB. *Mol. Microbiol.* 39(3): 606-619.
289. Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.
290. Thorns, C. J., M. M. Bell, M. G. Sojka and R. A. Nicholas. 1996. Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. *J. Clin. Microbiol.* 34(4): 792-797.
291. Tinge, S. A. and R. Curtiss. 1990. Isolation of the replication and partitioning regions of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid and stabilization of heterologous replicons. *J. Bacteriol.* 172(9): 5266-5277.
292. Tinge, S. A. and R. Curtiss. 1990. Conservation of *Salmonella typhimurium* virulence plasmid maintenance regions among *Salmonella* serovars as a basis for plasmid curing. *Infect. Immun.* 58(9): 3084-3092.
293. Trucksis, M., J. E. Galen, J. Michalski, A. Fasano and J. B. Kaper. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(11): 5267-5271.
294. Tsolis, R. M., L. G. Adams, T. A. Ficht and A. J. Bäumlner. 1999. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* 67(9): 4879-4885.

295. **Tsolis, R. M., S. M. Townsend, E. A. Miao, S. I. Miller, T. A. Ficht, L. G. Adams and A. J. Bäumler.** 1999. Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 67(12): 6385-6393.
296. **Uzzau, S., P. A. Gulig, B. Paglietti, G. Leori, B. A. Stocker and S. Rubino.** 2000. Role of the *Salmonella abortusovis* virulence plasmid in the infection of BALB/c mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 188(1): 15-18.
297. **Valdivia, R. H. and S. Falkow.** 1997. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277(5334): 2007-2011.
298. **Valone, S. E. and G. K. Chikami.** 1991. Characterization of three proteins expressed from the virulence region of plasmid pSDL2 in *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 59(10): 3511-3517.
299. **Valone, S. E., G. K. Chikami and V. L. Miller.** 1993. Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B, and -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 61(2): 705-713.
300. **van der Velden, A. W., A. J. Bäumler, R. M. Tsolis and F. Heffron.** 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* 66(6): 2803-2808.
301. **van der Walt, M. L. and A. S. Greeff.** 1998. The production of an auxotrophic marked, plasmid-cured *Salmonella* ser. Typhimurium as a live attenuated vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65(3): 213-220.
302. **van Duijkeren, E., C. Flemming, M. S. van Oldruitenborgh-Oosterbaan, H. C. Kalsbeek and J. W. van der Giessen.** 1995. Diagnosing salmonellosis in horses. Culturing of multiple versus single faecal samples. *Vet. Q.* 17(2): 63-66.
303. **Vandenbosch, J. L., D. K. Rabert and G. W. Jones.** 1987. Plasmid-associated resistance of *Salmonella typhimurium* to complement activated by the classical pathway. *Infect. Immun.* 55(11): 2645-2652.
304. **Vandenbosch, J. L., D. K. Rabert, D. R. Kurlandsky and G. W. Jones.** 1989. Sequence analysis of *rsk*, a portion of the 95-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* associated with resistance to the bactericidal activity of serum. *Infect. Immun.* 57(3): 850-857.
305. **Vanegas, R. A. and T. M. Joys.** 1995. Molecular analyses of the phase-2 antigen complex 1,2,.. of *Salmonella* spp. *J. Bacteriol.* 177(13): 3863-3864.
306. **Wallis, T. S., S. M. Paulin, J. S. Plested, P. R. Watson and P. W. Jones.** 1995. The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect. Immun.* 63(7): 2755-2761.
307. **Waterfield, N. R., D. J. Bowen, J. D. Fetherston, R. D. Perry and R. H. ffrench-Constant.** 2001. The *tc* genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiol.* 9(4): 185-191.
308. **Weide-Botjes, M., B. Kobe and S. Schwarz.** 1998. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis* isolates using molecular typing methods. *Zentralbl. Bakteriol.* 288(2): 181-193.

309. **Weiß, R., K. G. Drager, D. Cobanoglu and H. R. Schutze.** 1984. Zur Effizienz von modifiziertem Rappaportmedium, pH 7,0, zur Anreicherung von Salmonellen. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 97(6): 206-208.
310. **Weiss, R.** 2001. Persönliche Mitteilung.
311. **Wilcock, B. P., C. H. Armstrong and H. J. Olander.** 1976. The significance of the serotype in the clinical and pathological features of naturally occurring porcine salmonellosis. Can. J. Comp. Med. 40(1): 80-88.
312. **Williamson, C. M., G. D. Baird and E. J. Manning.** 1988. A common virulence region on plasmids from eleven serotypes of *Salmonella*. J. Gen. Microbiol. 134(Pt 4): 975-982.
313. **Williamson, C. M., G. D. Pullinger and A. J. Lax.** 1988. Identification of an essential virulence region on *Salmonella* plasmids. Microb. Pathog. 5(6): 469-473.
314. **Williamson, C. M., G. D. Pullinger and A. J. Lax.** 1990. Identification of proteins expressed by the essential virulence region of the *Salmonella dublin* plasmid. Microb. Pathog. 9(1): 61-66.
315. **Wilson, J. A., T. J. Doyle and P. A. Gulig.** 1997. Exponential-phase expression of *spvA* of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid: induction in intracellular salts medium and intracellularly in mice and cultured mammalian cells. Microbiology 143(Pt 12)(5): 3827-3839.
316. **Wilson, J. A. and P. A. Gulig.** 1998. Regulation of the *spvR* gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid during exponential-phase growth in intracellular salts medium and at stationary phase in L broth. Microbiology 144(Pt 7)(10): 1823-1833.
317. **Wood, M. W., J. Mahon and A. J. Lax.** 1994. Development of a probe and PCR primers specific to the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis*. Mol. Cell. Probes 8(6): 473-479.
318. **Woodward, M. J., I. McLaren and C. Wray.** 1989. Distribution of virulence plasmids within Salmonellae. J. Gen. Microbiol. 135(3): 503-511.
319. **Wray, C. and W. J. Sojka.** 1976. A study of the complement fixation test in *Salmonella dublin* infection. Res. Vet. Sci. 21(2): 184-189.
320. **Yabuuchi, E. and T. Ezaki.** 2000. Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *Salmonella choleraesuis* to '*Salmonella enterica*' and the creation of the term 'neotype species', and for conservation of *Salmonella choleraesuis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 Pt 4: 1693-1694.

## Anhang

### Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Medium	Substanz	Menge
<b>Luria-Bertani (LB)- Bouillon</b>	NaCl	5 g
	Hefe Extrakt	5 g
	Bacto <sup>®</sup> Trypton	10 g
	NaOH (1 M)	4 ml
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>Luria-Bertani (LB)-Agar</b>	NaCl	5 g
	Hefe Extrakt	2,5 g
	Bacto <sup>®</sup> Trypton	5 g
	Bacto <sup>®</sup> Agar	16 g
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,0
<b>Müller-Hinton (MH)- Bouillon</b>	Nr. 1.10293, Merck Eurolab GmbH	
<b>Müller-Hinton (MH)-Agar</b>	Nr. 1.10414, Merck Eurolab GmbH	
<b>Schafblut-Agar</b>	Blut-Agar (Basis)	5 % (w/v)
	Nr. 1.10886, Merck Eurolab GmbH defibriniertes Schafblut	5 % (v/v)

## Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
<b>Anodenpuffer I</b>	Tris (1 M)	300 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua destillata	500 ml
<b>Anodenpuffer II</b>	Tris (1 M)	25 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua destillata	770 ml
<b>Avertin</b>	2,2,2-Tribromethanol	2 g
	tert-amyl-Alkohol	2 ml
	Aqua destillata	ad 100 ml
	Erwärmen auf 50°C, Sterilfiltrieren, Autoklavieren, Lagerung bei -20°C	
<b>Blockstammlösung</b>	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	
		10 % (w/v)
	in Aqua destillata	
<b>Chloroform-Isoamylalkohol</b>	Chloroform	24 % (v/v)
	Isoamylalkohol	1 % (v/v)
<b>Chloronaphthol-Methanol</b>	Chloronaphthol	0,12 g
	Methanol	40 ml
<b>Coating-Puffer-Gebrauchslösung</b>	Lösung A	17 ml
	Lösung B	8 ml
	Aqua destillata	ad 100 ml
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	Eisessig	10 ml
	Methanol	40 ml
	Aqua destillata	50 ml
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Coomassie-Brilliant-Blau G250	100 mg
	Eisessig	10 ml
	Methanol	40 ml
	Aqua destillata	50 ml
<b>CSPD-Gebrauchslösung</b>	CSPD-Stammlösung (25 mM)	0,1 ml
	Detektionspuffer 3	9,9 ml
<b>CTAB/NaCl-Lösung</b>	Cetyltrimethylammonium Bromid in NaCl (0,7 M)	10 % (w/v)
<b>Denaturierungslösung</b>	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
	in Aqua destillata	

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Detektionspuffer 1</b>	Maleinsäure	25,21 g
	NaCl	17,52 g
	Aqua destillata	ad 2.000 ml
	NaOH	ad pH 7,5
<b>Detektionspuffer 2</b>	Blockstammlösung (10 %-ig) in Detektionspuffer 1	1 % (v/v)
<b>Detektionspuffer 3</b>	NaCl	5,85 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	10,17 g
	Tris-HCl (pH 9,5)	100 ml
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>DNS-Waschlösung 1</b>	20 x SSC	10 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	in Aqua destillata	
<b>DNS-Waschlösung 2</b>	20 x SSC	0,5 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	in Aqua destillata	
<b>DNS-Waschpuffer</b>	Tween 20 in Detektionspuffer 1	0,3 % (v/v)
<b>EDTA-Lösung (5 M, pH 8,0)</b>	Tritiplex III	186,1 g
	Aqua destillata	800,0 ml
	NaOH	ad pH 8,0
<b>Fixierer 1</b>	Methanol	40 ml
	Eisessig	10 ml
	Aqua destillata	50 ml
<b>Hybridisierungslösung</b>	Formamide	50 ml
	20 x SSC	25 ml
	Blockierungsreagenz	2 % (w/v)
	N-Laurolylsarkosin	0,1 g
	SDS (10 %)	0,2 ml
	Aqua destillata	ad 100 ml
<b>Kathodenpuffer</b>	Tris (1 M)	25 ml
	6-Aminocapronsäure	5,25 g
	Methanol	200 ml
	Aqua destillata	770 ml
<b>6 x Loading-Buffer</b>	Bromphenolblau	25 mg
	Ficoll	1,5 g
	Aqua destillata	9,5 ml
<b>Lösung A</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in Aqua destillata	0,2 M
<b>Lösung B</b>	NaHCO <sub>3</sub> in Aqua destillata	0,2 M

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Lysepuffer</b>	Tris	50 mM
	SDS	3 % (w/v)
	NaOH	75 mM
	in Aqua destillata	
<b>Neutralisationslösung</b>	Tris (pH 8,0)	0,5 mM
	NaCl	1,5 mM
	EDTA (pH 8,0)	1,0 mM
	in Aqua destillata	
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-Elutionspuffer</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	100 - 500 mM
	PMSF	1 mM
	in Aqua destillata	
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-Lysispuffer</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	5 mM
	PMSF	1 mM
	in Aqua destillata	
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA-Waschpuffer</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	15 - 60 mM
	PMSF	1 mM
	in Aqua destillata	
<b>OPD-Substratpuffer (pH 7,0)</b>	Zitronensäuremonohydrat	4,67 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,15 g
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>Phosphat-gepufferte Saline (PBS, pH 7,4)</b>	NaCl	10,00 g
	KCl	0,25 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,80 g
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>PBS-Tween (pH 7,2)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,47 g
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,5 g
	NaCl	8,18 g
	Tween 20	0,5 ml
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>Phenol-Chloroform-Lösung</b>	Phenol (58°C)	1 Vol
	Chloroform	1 Vol
<b>Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol</b>	Phenol (58°C)	25 % (v/v)
	Chloroform	24 % (v/v)
	Isoamylalkohol	1 % (v/v)

<b>Lösung</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
<b>Probenpuffer nach Lämml</b>	Tris-HCl (50 mM, pH 6,8)	1,25 % (v/v)
	Glycerin	1 % (w/v)
	SDS	2 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	0,5 % (v/v)
	Bromphenolblau (0,1 %) in Aqua destillata	0,25 % (w/v)
<b>Proteinkinase K-Lösung</b>	Proteinkinase K	20 mg
	Aqua destillata	ad 1 ml
	Lagerung bei -20°C	
<b>Puffer P1</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>Puffer P2</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>Puffer P3</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>Puffer QBT</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>Puffer QC</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>Puffer QF</b>	Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen, Hilden	
<b>20 x Saline-Sodium-Citrat (SSC, pH 7,0)</b>	NaCl	3 M
	Na-Citrat (pH 7,0)	0,3 M
	in Aqua destillata	
<b>10 x SDS-Elektrodenpuffer</b>	Tris-Base	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>analyt. SDS-Trenngel (Mini) (12 %)</b>	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	5 ml
	Tris-HCl (pH 8,8, 1,5 M)	2,5 ml
	SDS (20 %)	62,5 µl
	Harnstoff (8 M)	3,75 ml
	APS (10 %)	60 µl
	TEMED	10 µl
	Aqua destillata	890 µl
<b>präp. SDS-Trenngel (12 %)</b>	Acrylamid/Bisacrylamid (29,2 %/0,8 %)	8 ml
	Tris-HCl (pH 8,8, 1,5 M)	5 ml
	SDS (10 %)	200 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
	Aqua destillata	6,95 ml

Lösung	Substanz	Menge
<b>analyt. SDS-Sammelgel (Mini)</b> (5 %)	Acrylamid/Bisacrylamid (50 %/1,5 %)	250 µl
	Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	25 µl
	SDS (20 %)	12,5 µl
	APS (10 %)	75 µl
	TEMED	2,5 µl
	Aqua destillata	450 µl
<b>präp. SDS-Sammelgel</b> (3,8 %)	Acrylamid/Bisacrylamid (29,2 %/0,8 %)	650 µl
	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,25 ml
	SDS (10 %)	50 µl
	APS (10 %)	25 µl
	TEMED	5 µl
	Aqua destillata	3,1 ml
<b>50 x TAE-Laufpuffer</b>	Tris-Base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
	Aqua destillata	ad 1.000 ml
<b>TE-Puffer</b>	Tris (pH 7,4)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	HCl	ad pH 8,0
	in Aqua destillata	
<b>TFB I-Puffer (pH 5,8)</b>	Kaliumacetat	30 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Kaliumchlorid	100 mM
	Kalziumchlorid	10 mM
	in Aqua destillata	
	Glycerin	15 % (v/v)
<b>TFB II-Puffer (pH 7,0)</b>	Morpholinpropansulfonsäure (pH 7,0)	10 mM
	Kaliumchlorid	10 mM
	Kalziumchlorid	75 mM
	in Aqua destillata	
	Glycerin	15 % (v/v)
<b>Transferlösung</b>	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
	in Aqua destillata	

## Danksagung

Es bedurfte der Hilfe vieler Leute, damit diese Arbeit erstellt werden konnte. Ohne diese Unterstützung, wäre sie nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die Betreuung der Arbeit und für die Überlassung des Themas. Seine stets konstruktive Kritik, die vielen Anregungen, Diskussionen und auch die (manchmal mühsamen) Fragen ins Detail haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie die großzügig zu Verfügung gestellten Mittel zur Durchführung der Versuche.

Dem Geschäftsbereich Tiergesundheit der BAYER AG, Monheim, danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Stipendiums zur Doktorandenförderung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Genomics, der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Unterstützung bei der Sequenzierung.

Den Mitarbeitern des Bundesinstitut für Risikobewertung (ehemals Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) Berlin und Wernigerode, danke ich für die Hilfe bei der Serotypisierung sowie der Phagenbestimmung.

Anja danke ich für die umfassende Einarbeitung in die verwendeten Methoden und die moralische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Katja, Rolf und Rüdiger danke ich für die Hilfestellungen bei Statistik- und Rechtschreibfragen und Barbara, Astrid, Axel und allen anderen Doktoranden für die unvergessenen Tage im Labor !

Und schließlich danke ich meinen Eltern, deren seelische und finanzielle Unterstützung mir in der Zeit des Studiums und der Promotionsarbeit den Rücken gestärkt haben. Ohne sie wäre ich niemals dort, wo ich heute bin.



Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.