

Isolierung und Typisierung von
Salmonellen aus Trinkwasserquellen in
Benin, Westafrika

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Alexandra Uesbeck
aus Coesfeld

Köln, April 2009

Berichtersteller: Prof. Dr. Martin Krönke
Prof. Dr. Karin Schnetz

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2009



Cholera-Epidemie im Süden Benins von Juli bis Oktober 2005: 406 Fälle, 9 Tote

« ... LE TAUX DE MORTALITE DEPEND DU SYSTEME DE SURVEILLANCE DE LA MALADIE ET DE L'ACCES QUE LES MALADES PEUVENT AVOIR AUX CENTRES DE SOINS. IL FAUT DONC FAIRE D'AVANTAGE EN MATIERE DE PREVENTION, D'EDUCATION, D'HYGIENE, ET D'ACCES A L'EAU POTABLE.... »

Quelle: AFP, 18. Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG	1
1.1. DAS IMPETUS-PROJEKT	2
1.2. MIKROBIOLOGISCHE TRINKWASSERQUALITÄT	4
1.2.1. <i>Allgemein</i>	4
1.2.2. <i>Trinkwassersituation im oberen Ouémé Einzugsgebiet</i>	5
1.3. SALMONELLEN	8
1.3.1. <i>Taxonomie</i>	8
1.3.2. <i>Serotypisierung als „epidemiologisches Werkzeug“</i>	9
1.3.3. <i>Enteritische und typhöse Salmonellen</i>	10
1.3.4. <i>Infektionsdosis</i>	12
1.3.5. <i>Bedeutung von Salmonellen im Trinkwasser</i>	13
1.3.6. <i>Alternative Typisierungsmethoden für Salmonellen</i>	14
1.3.7. <i>Multilocus Sequence Typing (MLST)</i>	15
1.3.8. <i>Evolution von Bakterien</i>	19
1.3.9. <i>Pathogenität von Salmonellen</i>	20
1.4. ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG	23
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1. DAS UNTERSUCHUNGSGEBIET	24
2.1.1. <i>Die Brunnendatenbank</i>	24
2.1.2. <i>Die Latrinendatenbank</i>	25
2.1.3. <i>Befragungen der Wasserkonsumenten</i>	25
2.2. WASSER-BEPROBUNGEN	25
2.2.1. <i>Untersuchungen in ausgewählten Dörfern</i>	26
2.3. BAKTERIOLOGISCHE WASSERUNTERSUCHUNGEN	27
2.3.1. <i>Nachweis des Fäkalindikators Escherichia coli</i>	27
2.3.2. <i>Anreicherung und Isolierung von Salmonellen aus Wasser</i>	27
2.3.3. <i>Isolierung von Salmonellen aus Stuhlproben</i>	28
2.3.4. <i>Serotypisierung</i>	29
2.3.5. <i>Bestimmung der Antibiotika-Resistenzen</i>	29
2.3.6. <i>Stammsammlung</i>	30
2.4. MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)	30
2.4.1. <i>DNA-Isolierung</i>	31
2.4.2. <i>In vitro Amplifikation von DNA durch PCR</i>	31
2.4.3. <i>Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente</i>	32

2.4.4.	<i>Aufbereitung der PCR-Produkte</i>	33
2.4.5.	<i>Sequenzierung</i>	33
2.4.6.	<i>Auswertung der DNA-Sequenzen</i>	33
2.5.	SALMONELLA OUTER PROTEINS (SOP)	34
2.5.1.	<i>Nachweis der sop-Gene mittels PCR</i>	34
2.5.2.	<i>Präparation der Salmonella outer proteins</i>	35
2.5.3.	<i>Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE</i>	36
2.5.4.	<i>Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen</i>	37
2.5.5.	<i>Nachweis der Proteine mittels Western-Blot</i>	38
2.6.	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IN EINEM INFORMATIONEN-SYSTEM	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	UNZULÄNGLICHE TRINKWASSERVERSORGUNG UND –HYGIENE IM	
UNTERSUCHUNGSGBIET		40
3.1.1.	<i>Offene Brunnen als häufigste Trinkwasserquelle</i>	40
3.1.2.	<i>Unzureichender Zugang zu Pumpen in den Dörfern</i>	41
3.1.3.	<i>Fehlende sanitäre Einrichtungen</i>	42
3.1.4.	<i>Fäkale Verunreinigung des Trinkwassers</i>	42
3.2.	ISOLIERUNG VON SALMONELLEN	43
3.2.1.	<i>Kontamination des Trinkwassers durch Salmonellen</i>	43
3.2.2.	<i>Isolierung von Salmonellen aus Stuhlproben</i>	44
3.2.3.	<i>Identifizierung selten vorkommender Serotypen</i>	45
3.2.4.	<i>Überlebensdauer von Salmonellen in Wasserstellen</i>	53
3.2.5.	<i>Antibiotika-Resistenzen</i>	54
3.3.	MLST-ANALYSE	55
3.3.1.	<i>Amplifikation von housekeeping Gen-Abschnitten</i>	55
3.3.2.	<i>Unbekannte Allele und Sequenztypen (ST)</i>	56
3.3.3.	<i>Übereinstimmende Sequenztypen aus Wasser- und Stuhlproben</i>	61
3.3.4.	<i>Populationsstruktur beninischer Salmonella-Isolate</i>	62
3.4.	NACHWEIS DER SALMONELLA OUTER PROTEINS (SOP)	71
3.4.1.	<i>Vorhandensein der sop-Gene</i>	71
3.4.2.	<i>Expressions-Untersuchungen der Sop</i>	71
3.5.	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IN DEM IS SALMÉAU	76
4.	DISKUSSION	77
4.1.	INFEKTIONSRISSIKO FÜR DIE WASSERKONSUMENTEN	77
4.2.	TRINKWASSER IM OBEREN OUÉMÉ EINZUGSGEBIET	78
4.2.1.	<i>Die Trinkwasserhygiene</i>	78
4.2.2.	<i>Transport und Wasserlagerung auf Haushaltsebene</i>	82
4.2.3.	<i>Das siebte UN Millennium Development Goal</i>	82
4.3.	BENINISCHE SALMONELLA ISOLATE	85
4.3.1.	<i>Aus Wasser isolierte Stämme</i>	85

4.3.2.	<i>Stuhl-Untersuchungen in dem Dorf Kaki Koka</i>	88
4.3.3.	<i>Salmonella outer proteins (Sop)</i>	89
4.3.4.	<i>Typisierung der Salmonellen mittels MLST</i>	90
4.4.	AUSBLICK	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	93
6.	SUMMARY	95
7.	RÉSUMÉ	96
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
9.	TABELLENVERZEICHNIS	100
10.	LITERATURVERZEICHNIS	102
11.	ANHANG	113
11.1.	FRAGEBOGEN FÜR WASSERKONSUMENTEN	113
11.2.	ÜBERSICHTSTABELLE ERGEBNISSE	115
11.3.	SEQUENZEN NEU IDENTIFIZIERTER MLST-ALLELE	125
	DANKSAGUNG	143
	ERKLÄRUNG	144

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AEV	<i>Adduction d'eau villageoise</i>
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AST	<i>Antimicrobial susceptibility typing</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphatase
bidest.	doppelt destilliert (Reinstwasser)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
C	Celsius
ca.	circa
DG-Eau	<i>Direction Général de l'Eau</i> (Nationale Wasserbehörde in Benin)
DHAB	<i>Direction de l'hygiène et de l'assainissement de base</i> (Nationale Hygienebehörde in Benin)
DLV	<i>Double Locus Variant</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
e	<i>eBurstGroup</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
g	Gramm
GLOWA	Globaler Wandel des Wasserkreislaufes
h	Stunde
HVO	<i>Haute Vallée de l'Ouémé</i> (oberes Ouémé Einzugsgebiet)
IMPETUS	Integratives Management-Projekt für einen effizienten und tragfähigen Umgang mit Süßwasser in Westafrika
INSAE	<i>Institut National de la Statistique et de L'Analyse Économique</i>
IS	Informationssystem
JA	<i>Jarre</i> (Behältnis zur Wasserlagerung im Haushalt)
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
mA	Milliampere
MA	<i>Marigot</i> (Tümpel)
MDG7	Siebtens <i>Millennium Development Goal</i>
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
min.	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MLVA	<i>Multilocus variable-number tandem repeats</i> Analyse
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i> (Nitrotetrazoliumblau)
n.d.	<i>not done</i>
ng	Nanogramm
NGO	<i>Non-Governmental Organization</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase- Ketten-Reaktion)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
prov	provisorische Gruppe
PT	<i>Puits traditionnel</i> (traditioneller Brunnen)
PM	<i>Puits moderne</i> (moderner Brunnen)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RKI	Robert Koch Institut
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
S.	<i>Salmonella</i>
s.	siehe
SalmEau	<i>Contamination des sources d'eau par des Salmonelles entéritiques dans la HVO, Bénin</i> (Kontamination von Wasserstellen durch enteritische Salmonellen im oberen Ouémé Einzugsgebiet, Benin)

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SLV	<i>Single Locus Variant</i>
SONEB	<i>Société Nationale des Eaux du Bénin</i> (Nationale Wassergesellschaft in Benin)
Sop	<i>Salmonella outer protein</i>
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
spp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
st.	menschlicher Stuhl
T3SS	Typ- III- Sekretions- System
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Ethidiumbromid
TBS + Tween	<i>tris-buffered saline</i> + Tween 20
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´N´-Tetramethylethylendiamin
TLV	<i>Triple Locus Variant</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCC	<i>University College Cork</i>
ü.N.	über Nacht
UN	<i>United Nations</i>
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
V	Volt
Vgl.	Vergleich
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln

1. Einleitung

Das siebte Millennium Development Goal der Vereinten Nationen sieht vor, weltweit die Anzahl der Menschen ohne Zugang zu sauberem Trinkwasser bis zum Jahr 2015 zu halbieren (UNITED NATIONS 2001). Dies ist für das kleine westafrikanische Land Benin ein sehr ehrgeiziges Vorhaben, da bislang nur 63 % der Gesamtbevölkerung und 55 % der Landbevölkerung überhaupt Zugang zu verbesserten Wasserquellen haben. Sanitäre Einrichtungen stehen nur 23 % der Gesamt- und 6 % der Landbevölkerung zur Verfügung (WHO/UNICEF JOINT MONITORING PROGRAMME FOR WATER SUPPLY AND SANITATION 2000). Dementsprechend kommt es in Benin immer wieder zu Choleraepidemien (WHO 2007) – zuletzt im Jahr 2008 in Cotonou mit 503 Erkrankten und 2 Toten (WHO 2008b). Die Gesundheitssituation ist gekennzeichnet durch eine sehr hohe Kindersterblichkeit und eine geringe Lebenserwartung (Tab. 1).

Tabelle 1: Gesundheitsindikatoren für Benin für das Jahr 2004
(Quelle: WHO, 2006: Country Health System Fact Sheet, Benin)

Parameter	Männlich	Weiblich
Lebenserwartung bei Geburt (in Jahren)	52	53
Kindersterblichkeit Unter-5-Jähriger (pro 1000)	152	152
Erwachsenensterblichkeit (pro 1000)	388	350
Müttersterblichkeit (pro 100 000 Lebendgeburten)		850

Ein Großteil der ländlichen Bevölkerung im oberen Ouémé Einzugsgebiet in Zentral-Benin ist auf Oberflächenwasser aus offenen Brunnen oder Tümpeln als Trinkwasser angewiesen, da sicheres Trinkwasser aus Pumpenanlagen nur eingeschränkt zu Verfügung steht. Wasserqualitäts-Untersuchungen, die im Rahmen des Forschungsprojektes IMPETUS im Laufe der vergangenen Jahre durchgeführt wurden, zeigen, dass die Mehrzahl der Wasserquellen in dem Untersuchungsgebiet durch *E. coli* kontaminiert ist (SAUTER 2006; MAZOU 2008). Dieser Nachweis von Kontaminationen mit Keimen der Fäkalflora liefert Grund zu der Annahme, dass eine Vielzahl weiterer pathogener Mikroorganismen im Wasser anwesend sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wasserproben auf Kontaminationen durch Salmonellen untersucht. Die Isolate wurden mittels *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

typisiert und das durch sie bedingte Gesundheitsrisiko für die Wasserkonsumenten abgeschätzt.

1.1. Das IMPETUS-Projekt

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes IMPETUS (Integratives Management Projekt für einen Effizienten und Tragfähigen Umgang mit Süßwasser in Westafrika) der Universitäten zu Köln und Bonn durchgeführt, das in das global angelegte, anwendungsorientierte Projekt GLOWA (Globaler Wandel des Wasserhaushaltes) des BMBF eingebettet ist. Das übergeordnete Ziel ist die Erforschung der Wasserkreisläufe verschiedener Flusseinzugsgebiete unter Berücksichtigung des globalen Wandels und die Entwicklung von Entscheidungsunterstützungs- und Informationssystemen, um ein nachhaltiges Management der lebensnotwendigen Ressource Wasser zu ermöglichen. IMPETUS untersucht am Beispiel der Flusseinzugsgebiete des Draâ in Marokko und des oberen Ouémé in Benin (Abb. 1) alle Aspekte des hydrologischen Kreislaufes in Westafrika nördlich und südlich der Sahara. In einem interdisziplinären Ansatz werden die Themenkomplexe

- Niederschlagsvariabilität
- Wechselwirkungen zwischen Wasserkreislauf, Biosphäre und Landnutzung
- Wasserverfügbarkeit und –qualität
- Nutzungskonflikte, anthropogene Einflüsse

untersucht (CHRISTOPH *et al.* 2008).

Die Arbeit des Projektes wurde in drei jeweils dreijährige Phasen eingeteilt:

Phase 1: Untersuchung der verschiedenen Aspekte des Wasserkreislaufes und deren Wechselbeziehung

Phase 2: Entwicklung von Modellen und Szenarien zur Simulation zukünftiger Veränderungen

Phase 3: Entwicklung und Bereitstellung von operationellen Werkzeugen für Entscheidungsträger, denen damit eine umfassende Abschätzung von Risiken und Auswirkungen auf lokaler und regionaler Ebene ermöglicht werden soll.



Abbildung 1: Administrative Karte von Benin (Quelle: HELDMANN 2008c)

1.2. Mikrobiologische Trinkwasserqualität

1.2.1. Allgemein

Regelmäßige mikrobiologische Trinkwasseruntersuchungen gewährleisten eine möglichst frühzeitige Erfassung von seuchenhygienisch relevanten Kontaminationen, die eine Gefährdung für die Konsumenten darstellen. Generell ist das Risiko einer Infektion besonders groß, wenn Wasser konsumiert wird, das mit menschlichen oder tierischen Fäkalien kontaminiert ist. Fäkalien können eine Quelle für verschiedene pathogene Bakterien, Viren (z.B. Adeno- und Rotaviren (VERHEYEN *et al.* 2009) oder Protozoen und Helminthen sein (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WATER SANITATION AND HEALTH TEAM 2006). Da der Nachweis einiger relevanter Krankheitserreger sehr aufwändig oder unzuverlässig sein kann, werden Indikatorbakterien untersucht, die Hinweise auf mögliche gesundheitsgefährdende mikrobielle Kontaminationen des Trinkwassers geben. Wasser stellt als oligotrophes Medium keinen optimalen Nährboden für Krankheitserreger dar, weil sie wertvollere Nährsubstanzen und höhere Temperaturen zum Überleben oder für ihr Wachstum brauchen (CARLSON 2000). Aus diesem Grund wurden Indikatororganismen ermittelt, die folgende Kriterien erfüllen (MARA 2003):

- sie kommen in Abwasser und in Wasser, das möglicherweise durch pathogene Bakterien verunreinigt ist, vor
- sie sind in größerer Zahl präsent als die pathogenen Bakterien
- sie sind auch in sehr geringen Konzentrationen noch nachweisbar.

Ursprünglich galten auch coliforme Bakterien als Indikatoren für die mikrobiologische Trinkwasserqualität. Zu dieser Gruppe gehören folgende Gattungen: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* und *Yersinia*. Als solche sind sie definiert durch ihre Morphologie - aerobe und fakultativ anaerobe, Gram-negative Stäbchen, die keine Sporen bilden - und ihr Vermögen, Laktose bei 35 °C abzubauen und dabei Säure und Gas zu bilden. *Escherichia coli* ist in der Lage, bei 44°C zu wachsen, Laktose zu spalten und Tryptophan zu Indol abzubauen. *E. coli* gilt als

zuverlässigster Indikator zur Einschätzung der Gefahr wassergebundener Durchfallerkrankungen in tropischen Ländern (MARA 2003; MOE *et al.* 1991). Nach der aktuellen deutschen Trinkwasserverordnung spielt die Bestimmung coliformer Bakterien wegen ihres Vorkommens auch in der Umwelt keine Rolle mehr für die Einschätzung der bakteriologischen Trinkwasserqualität. Heutzutage dient *E. coli* als einziger Indikatorkeim zur Detektion fäkaler Verunreinigungen (GROHMANN *et al.* 2003).

1.2.2. Trinkwassersituation im oberen Ouémé Einzugsgebiet

Laut deutscher Trinkwasserverordnung muss „Wasser für den menschlichen Gebrauch frei von Krankheitserregern, genusstauglich und rein sein“ (GROHMANN *et al.* 2003). Wie LOHNER (2003) und SAUTER (2006) festgestellt haben, entspricht die wasserhygienische Situation im ländlichen Benin keinesfalls diesen Anforderungen. Die von Sauter 2001 im oberen Ouémé Einzugsgebiet durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass 72 % der von der Bevölkerung genutzten Trinkwasserquellen Kontaminationen durch *E. coli* aufwiesen. Seit 2001 werden im Rahmen des Forschungsprojektes IMPETUS regelmäßig bakteriologische Trinkwasseruntersuchungen in den Dörfern des oberen Ouémé Einzugsgebietes durchgeführt. Den Einwohnern dieser Dörfern stehen für die Versorgung mit Wasser meist nur offene Brunnen (Abb. 2 a) und b), Abb. 3) zur Verfügung. Bakteriologisch unbedenklicheres Wasser aus Bohrlöchern, die mit geschlossenen Pumpensystemen versehen sind (Abb. 2 d), Abb. 3), ist nur einem begrenzten Anteil der Landbevölkerung zugänglich (SAUTER 2006; MAZOU *et al.* 2008). In besonderen Notlagen sind die Menschen gezwungen, auf einfache ungeschützte Wasserlöcher, so genannte *Marigots* (Abb. 2 c), als Trinkwasserquelle zurückzugreifen. In der Trockenzeit leiden die Menschen unter Wassermangel, da viele der offenen Brunnenanlagen schon nach wenigen regenfreien Wochen austrocknen. Nur wenige Dörfer, die sich in unmittelbarer Nähe zu einer der drei Städte befinden (Abb. 3), wurden seit 2006 an die zentrale Wasserversorgung angeschlossen oder verfügen mittlerweile über ein so genanntes AEV (*Adduction d'Eau Villageoise*) – ein Bohrloch, von dem Wasser in einen Wasserturm gepumpt

wird, der mehrere Wasseranschlüsse in einem Dorf speist. Eine regelmäßige, von staatlichen Behörden durchgeführte Überwachung der Trinkwasserqualität, wie sie in Europa durch Trinkwasserverordnungen geregelt ist, findet in den Dörfern Benins nicht statt. Da die Ergebnisse vergangener Studien (SAUTER 2006, LOHNER 2003) gezeigt haben, dass *E. coli* fast ubiquitär in den offenen Wasserstellen des oberen Ouémé Einzugsgebietes vorkommt, wurde für diese Arbeit *Salmonella enterica* neben *E. coli* als Indikatorkeim zur Einschätzung der Infektionsgefahr für die Wasserkonsumenten nachgewiesen.



Abbildung 2: Im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet zur Verfügung stehende Trinkwasserquellen: **a)** traditioneller Brunnen **b)** moderner Brunnen **c)** *Marigot* (Tümpel) **d)** Pumpe

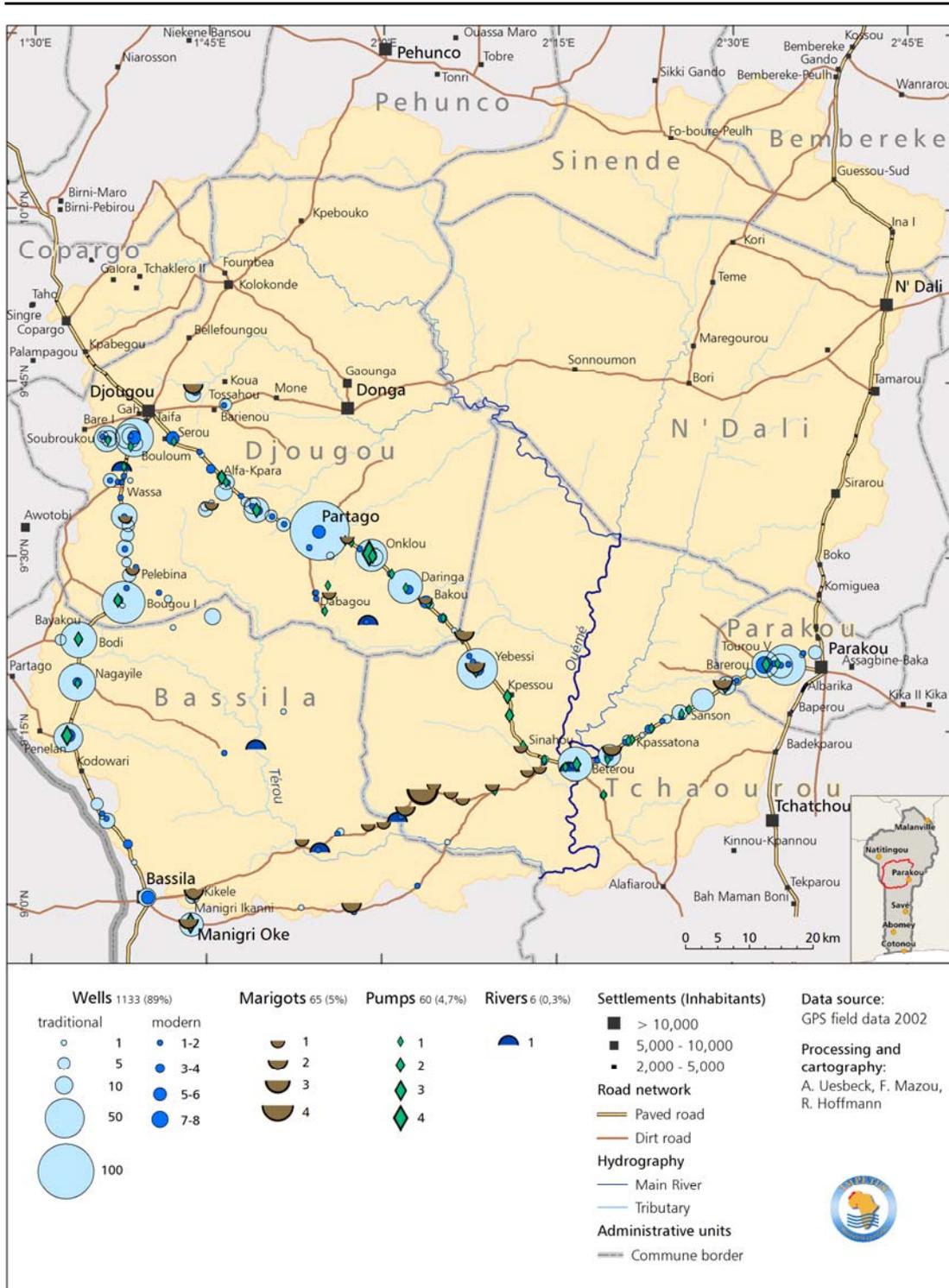


Abbildung 3: Situation der Trinkwasserversorgung im oberen Ouémé Einzugsgebiet in Zentral-Benin: Die Verteilung der verschiedenen Arten von Wasserquellen in dem Städtedreieck Parakou-Bassila-Djougou, Stand 2002. (Quelle: MAZOU *et al.* 2008)

1.3. Salmonellen

Salmonellen sind Gamma-Proteobakterien der Familie der Enterobacteriaceae. Sie wurden von dem amerikanischen Bakteriologen Theobald Smith (1859-1943) entdeckt und erhielten ihren Namen von dem amerikanischen Tierarzt D. E. Salmon (1850-1914) (MOCHMANN und KÖHLER 1997). Es handelt sich um Gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, stäbchenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von ca. 0,7-1,5 µm und einer Länge von 2-5 µm. Sie sind Oxidase-negativ, fermentieren Glukose, decarboxylieren Lysin, Arginin sowie Ornithin, bilden meist H₂S und sind nicht in der Lage, Laktose zu spalten. Mit Ausnahme von *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* sind Salmonellen peritrich begeißelt und somit aktiv beweglich, wobei auch Stämme anderer Serovare ihre Beweglichkeit durch Funktionsunfähigkeit der Geißeln verlieren können. Ihre Vermehrungstemperatur liegt zwischen 5,2°C und 46,2°C mit einem Optimum zwischen 35°C – 45°C. Salmonellen kommen in der Natur in kalt- und warmblütigen Tieren, Menschen sowie in Habitaten außerhalb von Lebewesen, wie z.B. Wasser, vor.

1.3.1. Taxonomie

Ursprünglich wurden die Salmonellen nach klinischen Gesichtspunkten benannt – beispielsweise wie *S. Choleraesuis* auf den Erreger der Cholera des Schweins und *S. Typhimurium* auf den Erreger des Typhus bei Mäusen hin. Nachdem erkannt wurde, dass eine strikte Wirtsspezifität mancher Arten nicht besteht - *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* sind auch humanpathogen - wurden neue Serovare nach dem Ort, an dem der erste Stamm isoliert wurde, benannt (GRIMONT 2007). Im Laufe der Zeit haben verschiedene Wissenschaftler versucht, Ordnung in die Einteilung der Gattung *Salmonella* in verschiedene Subspezies zu bringen. Auf Grundlage der taxonomischen Untersuchungen von LE MINOR und POPOFF (1987) und REEVES *et al.* (1989) wird die Gattung *Salmonella* heute in nur zwei Arten unterteilt: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* (TINDALL *et al.* 2005). LE MINOR und POPOFF (1987) zeigten darüber hinaus,

dass sich die Art *Salmonella enterica* wiederum aufgrund biochemischer Merkmale in mehrere Subspezies unterteilt (Tab. 2).

Tabelle 2: Einteilung der Gattung *Salmonella* in Spezies und Subspezies

Spezies	Subspezies
<i>Salmonella enterica</i>	Subspezies I: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>enterica</i>
	Subspezies II: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>salamae</i>
	Subspezies IIIa: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>arizonae</i>
	Subspezies IIIb: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>diarizonae</i>
	Subspezies IV: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>houtenae</i>
	Subspezies VI: <i>Salmonella enterica</i> spp. <i>indica</i>
<i>Salmonella bongori</i>	

Die Subspezies werden nach Bestimmung der Antigeneigenschaften anhand des White-Kauffmann-Le Minor Schemas in mittlerweile 2579 verschiedene Serovare unterschieden (GRIMONT UND WEILL 2007) (s. 1.3.2.). Eigennamen wurden nur für die Serovare der Subspezies I, *S. enterica* spp. *enterica* aufrechterhalten, der 99,5 % aller isolierten Salmonellen-Stämme angehören.

Nach derzeitigem Stand wäre die korrekte biologische Bezeichnung eines Serotypen beispielsweise:

Salmonella enterica spp. *enterica* Serovar Enteritidis.

Da diese Kombination kompliziert ist, wird praktischerweise nur die Serovar-Bezeichnung angegeben, wobei der Name nicht kursiv geschrieben wird, wie es bei Artbezeichnungen üblich ist, und die Bezeichnung des Serovars mit einem Großbuchstaben beginnt:

Salmonella Enteritidis.

1.3.2. Serotypisierung als „epidemiologisches Werkzeug“

Zur Klärung epidemiologischer Zusammenhänge beim Ausbruch einer Salmonellose gibt es verschiedene Typisierungsmethoden. Klassischerweise wird zunächst mittels Agglutination mit omnivalenten *Salmonella*-Antiseren die Antigenformel bestimmt. Für die Einteilung in die verschiedenen Serotypen werden die drei verschiedenen Oberflächenantigene der Salmonellen, die H, O und Vi-Antigene, bestimmt.

Stämme mit identischen O- und H-Antigenen, also mit der gleichen Antigenformel, gehören zum gleichen Serotypen, der mit Hilfe des Klassifizierungssystems White-Kauffmann-Le Minor ermittelt werden kann. Die O- (oder Körper- oder Oberflächen- oder somatische) Antigene sind als Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) der Zellwand in der äußeren Membran lokalisiert. Die über 60 verschiedenen O-Antigene werden im White-Kauffmann-Le Minor Schema durch Zahlen angegeben und Salmonellen mit gleichen O-Antigenen werden der gleichen Gruppe zugeteilt (GRIMONT und WEILL 2007). Die H- (oder Geißel-) Antigene entsprechen den Proteinbausteinen der Geißeln und können in zwei Phasen (H1 und H2) unterteilt werden, da die Antigenstruktur der Geißeln sich aus zwei Gruppen unterschiedlicher Proteine herleitet, die in unterschiedlichen genetischen Bereichen determiniert sind. Meist wird nur eine der beiden H-Phasen ausgebildet. Mit „Phase 1“ und „Phase 2“ sind zwei Sub-Populationen der Zellen gemeint, wobei jede Zelle nur jeweils eines der beiden Antigene exprimiert. Durch Trennung dieser beiden Sub-Populationen auf Schwärm-Agar können die beiden H-Phasen bestimmt werden (LINDQUIST 1998). Die H-Antigene der 1. Phase (H1) werden in der Regel durch Kleinbuchstaben und zusätzlicher Nummerierung des z (z_1, z_2, \dots) angegeben und die der 2. Phase (H2) in erster Linie durch Zahlen, aber auch durch Kleinbuchstaben. Ursprünglich wurde die Bezeichnung „H“ zur Beschreibung der Beweglichkeit (des Schwärmverhaltens in halbfestem Agar) gewählt, da das Erscheinungsbild einem „Hauch“ ähnelte. Da die O-Antigene zuerst bei unbegeißelten Bakterienstämmen gefunden wurden, stand das „O“ ursprünglich für „ohne Hauch“, da die Bakterien nicht in der Lage waren, zu schwärmen. Die K- oder Vi-Antigene (Kapsel- oder Virulenz-Antigene) sind zusätzliche Antigene, die nur bei *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* und *S. Dublin* vorkommen (BOCKEMÜHL 1992). Es handelt sich um Bauelemente der Mikrokapsel, die der eigentlichen Zellwand aufgelagert sind.

1.3.3. Enteritische und typhöse Salmonellen

Klinisch relevant sind vor allem die Vertreter der Subspezies I, wohingegen die anderen fünf Subspezies sowie *S. bongori* nur sporadisch

bei Patienten mit Diarrhö isoliert werden, häufiger aber bei Geflügel-Darmerkrankungen oder bei Kaltblütern (Reptilien, Schildkröten) vorkommen und daher lebensmittelhygienisch weniger relevant sind. Die humanpathogene Subspezies *Salmonella enterica* wird hinsichtlich infektiologischer und pathogenetischer Unterschiede in zwei Gruppen unterteilt:

- enteritische Salmonellen
- typhöse Salmonellen

Infektionen durch enteritische Salmonellen sind nach Angaben des Zentrums für Infektionsepidemiologie des Robert-Koch-Instituts in Berlin die häufigste erfasste Ursache von Durchfallerkrankungen beim Menschen (KOCH 2001). Die so genannte Salmonellose verläuft in den meisten Fällen als lokal begrenzte, spontan ausheilende Durchfallerkrankung, die in der Regel nicht antibiotisch behandelt werden muss. Einige Serovare (*S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*) können allerdings besonders bei alten, immunsupprimierten Menschen oder kleinen Kindern schwere Bakteriämien und sogar Sepsen verursachen (KLEER 2003). Die Ausscheidungsdauer beträgt einige Wochen bis Monate, wohingegen langjähriges Dauerausscheidertum nur sehr selten vorkommt. Obwohl grundsätzlich alle Serovare für den Menschen als Infektionsquelle in Frage kommen, sind es von den 2579 bekannten Serovaren nur 10 bis 20, die bei der Salmonellose des Menschen vorherrschen. Bei einem von 1990 bis 1995 in 191 WHO-Mitgliedstaaten durchgeführten globalen Survey wurde festgestellt, dass nur 10 Serovare für 93 % der untersuchten Fälle verantwortlich waren (HERIKSTAD *et al.* 2002). Vorherrschend waren besonders die drei Serotypen *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium und Typhi, die zusammen 76,1 % aller weltweit registrierten Isolate ausmachten. Häufig sind tierische Lebensmittel wie Geflügel- oder Schweinefleisch, Speisen mit Rohei, Rohmilch oder auch Muscheln und Fisch die Ursache für Salmonellosen, aber auch Lebensmittel wie Schokolade (ROBERT KOCH INSTITUT 2002), Obst, Gemüse, Gewürze und Tee können in seltenen Fällen kontaminiert sein (KLEER 2003).

Zu den typhösen Salmonellen werden die Serovare *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B und selten C gezählt. *S. Typhi* ist im Gegensatz zu den enteritischen

Salmonellen streng wirtsadaptiert und kommt somit als Infektionserreger ausschließlich beim Menschen vor. Typhöse Salmonellen sind invasiv und gelangen, nachdem sie sich in Leber und Milz vermehrt haben, in den Blutkreislauf, so dass sie nach 1 – 3 wöchiger Inkubation zu septikämischen Allgemeininfektionen mit schwerem Krankheitsbild führen können (hohes Fieber, Kopfschmerzen, Benommenheit, sekundär auch Darmsymptome) (BOCKEMÜHL 1992). In vielen Teilen der Welt ist Typhus nach wie vor eine häufig auftretende Infektionserkrankung, die unbehandelt in 15 - 20 % der Fälle zum Tode führt, wohingegen eine Antibiotika-Therapie das Risiko auf 1 - 2 % verringert. 2 - 5 % der Patienten können chronische Träger von *Salmonella* Typhi werden (HOF 2000, WORLD HEALTH ORGANIZATION 2008).

1.3.4. Infektionsdosis

In Bezug auf die Infektionsdosis gibt es sowohl für enteritische als auch für typhöse Salmonellen unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Angaben in der Literatur (MASTROENI und MASKELL 2006) (Tab. 3), wie aus dem Zitat von HUNTER (1997) deutlich wird:

„Based on volunteer experiments, it was thought that the infectious dose for non-typhoid salmonellosis was of the order of 10^9 organisms. However, evidence from many recent outbreaks suggests that the infectious dose is certainly below 1000 and possibly 10 organisms”

Tabelle 3: Literaturangaben zur Infektionsdosis von enteritischen und typhösen Salmonellen

Referenz	Angaben Infektionsdosis Salmonellen		Anmerkungen
	Enteritische	Typhöse	
HOF 2000	10^5 bis 10^6 Zellen	100– 1000 Zellen	-
ROBERT KOCH INSTITUT 2002	5–40 Zellen	k.A.	Ausbrüche durch Schokolade: (S. Eastborne, S.Napoli, S.Nima)
LINDQUIST 1998	10^8 Zellen	10^8 Zellen	<i>„although there are reports of as few as 100 cells being able to cause gastroenteritis”</i>
KLEER 2003	$> 10^5$ – 10^6 Zellen	wenige Zellen genügen	Ergebnis für enteritische Salmonellen aus Freiwilligen-Versuchen an gesunden Strafgefangenen

Referenz	Angaben Infektionsdosis Salmonellen		Anmerkungen
	Enteritische	Typhöse	
CARLSON 2000	> 10 ⁵ Zellen	„selbst Verschlucken von einigen Tausend Paratyphus- und Typhusbakterien führt nur selten zu einer Infektion“	Verminderte Magensaftsekretion, voluminöse Speisen, Resistenzminderung, höheres o. jüngeres Alter ermöglichen eine Infektion durch geringere Erregerzahlen (10 ² -10 ³)
KAYSER 2001	> 10 ⁶ Zellen	10 ² -10 ³ Zellen	-
BOCKEMÜHL 1992	10 ² -10 ³ Zellen	>10 ⁵ Zellen	-
KÖHLER 2001	10 ³ – 10 ⁵ Zellen	10 ⁵ – 10 ⁹ Zellen	-
HUNTER 1997	100 – 10 ⁹ Zellen	10 ³ Zellen	siehe Zitat oben

Die Infektionsdosis ist abhängig von vielen Faktoren, wie dem physiologischen Zustand der Bakterienzellen, der Matrix, in welcher die Bakterien aufgenommen werden, der Zusammensetzung der Mahlzeit und dem körperlichen Zustand des Konsumenten (MASTROENI und MASKELL 2006). Die Abwehrkräfte eines gesunden erwachsenen Menschen sind in der Lage, größere Mengen von Mikroorganismen zu vernichten, als alte, kranke und immungeschwächte Menschen und Kinder unter fünf Jahren. Auch spielt die Zahl der aufgenommenen Zellen eine Rolle beim Krankheitsverlauf und der Dauer der Inkubation: hohe Dosen sind eher mit kurzen Inkubationszeiten und schwereren Verlaufsformen verbunden (KLEER 2003).

1.3.5. Bedeutung von Salmonellen im Trinkwasser

Salmonellen sind sehr widerstandsfähig und können auch in offenen Gewässern, Brunnen oder Jauchegruben wochenlang überleben (BAUDART *et al.* 2000). Wenn Eiweißstoffe und genügend Sauerstoff vorhanden sind, kann sogar eine erhebliche Vermehrung eintreten. Der Nachweis von Salmonellen in Wasser kann auch positiv ausfallen, wenn *E. coli* oder coliforme Bakterien in der Probe zu fehlen scheinen (CARLSON 2000, SAUTER 2006). Trotz ihrer weiten Verbreitung sind enteritische Salmonellen nur selten Auslöser wasserassoziierter Krankheiten (WHO WORK PROGRAMME 2004; TAYLOR *et al.* 2000; MOLINERO *et al.* 1998; HUNTER 1997). Bekannt wurden folgende Ausbrüche von Salmonellose bedingt durch kontaminiertes Wasser:

-
- 1965 sind in Riverside, Californien 16 000 Infektionen mit 3 Todesfällen durch *S. Typhimurium* verursacht worden (GREENBERG und ONGERTH 1966).
 - 1976 erkrankten 63 Menschen aus einer Gruppe Camper durch mit *S. Arechevalata* kontaminiertes Trinkwasser in Trinidad (KOPLAN *et al.* 1978). Regenwasser, das von einem mit Vogelkot verschmutzten Dach in das Trinkwasserreservoir der Gruppe floss, war die Ursache der Kontamination.
 - MOLINERO *et al.* (1998) beschrieben einen Salmonellose-Ausbruch verursacht durch *S. Ohio*, die im kontaminierten Trinkwasser einer ungechlorten Wasser-Zapfstelle nachgewiesen werden konnten.
 - Ein mit *S. Saintpaul* kontaminierter Wassertank führte zu 28 Fällen von Gastroenteritis unter den 200 Arbeitern, die das Wasser konsumierten (TAYLOR *et al.* 2000).

Typhus hingegen ist eine Infektion, bei deren Verbreitung Wasser besonders in Entwicklungsländern eine maßgebliche Rolle spielt. In entwickelten Ländern haben Typhus und Paratyphus an Bedeutung verloren, aber weltweit erkranken weiterhin ca. 16 - 33 Mio. Menschen jährlich daran, von denen ca. 216 000 – 600 000 sterben (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2008). Die größte Ansteckungsgefahr für die Wasserkonsumenten besteht, wenn kontaminiertes Wasser für die Zubereitung von leicht verderblichen Speisen benutzt wird bzw. mit ihnen in Berührung kommt, und die Mikroorganismen die Möglichkeit zur Vermehrung haben (CARLSON 2000).

1.3.6. Alternative Typisierungsmethoden für Salmonellen

Für die Erkennung präziser epidemiologischer Zusammenhänge von Salmonellen-Ausbrüchen ist die reine Bestimmung der Antigenformel und die Zuordnung des Serotypen anhand des White-Kauffmann-Le Minor Schemas häufig nicht ausreichend. Zur Feindifferenzierung stehen mehrere Methoden zur Verfügung, wie beispielsweise die Phagentypisierung, die für einige Serotypen wie *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis, Hadar, Virchow, Heidelberg, Agona, Bovismorbificans, Typhi und Paratyphi A etabliert wurde (<http://www.rki.de>). Aufgrund der Wirtsspezifität verschiedener verwendeter

Bakteriophagen kann der Lysotyp bestimmt werden. Durch die Erstellung eines Antibiotika-Resistenzprofils - dem *Antimicrobial susceptibility typing* (AST) - kann das Empfindlichkeitsmuster eines Stammes mit dem eines anderen verglichen werden (HARBOTTLE *et al.* 2006). Molekularbiologische Verfahren stützen sich direkt auf die Eigenschaften der DNA und erlauben eine Differenzierung der Erreger anhand von DNA-Polymorphismen, wie beispielsweise Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Plasmid-Fingerprinting* oder MLVA (*Multi-locus variable-number tandem repeats* Analyse) (MASTROENI und MASKELL 2006, WICHELHAUS *et al.* 2000, MALORNY *et al.* 2008, RUIZ *et al.* 2003). Viele Typisierungsmethoden haben den Nachteil, dass die Ergebnisse nur unter bestimmten Bedingungen von einzelnen Laboratorien reproduzierbar und somit nur schlecht miteinander vergleichbar sind und dass sie eine Ableitung der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse untersuchter Isolate nicht zulassen. Für die Typisierung der beninischen *Salmonella*-Stämme wurde *Multilocus Sequence Typing* (MLST) gewählt, da es mehrere Vorteile im Vergleich zu vielen anderen Typisierungsmethoden aufweist. Zum Einen ist es mit MLST möglich, DNA-Sequenzdaten verschiedener Laboratorien miteinander zu vergleichen, die Daten via Internet abzugleichen und zu transferieren und somit einer großen Anzahl von Personen zugänglich zu machen. Zum Anderen ermöglicht es die Erforschung bakterieller Populationsstrukturen.

1.3.7. *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

MAIDEN *et al.* wandten 1998 als erste ein Schema für *Multilocus Sequence Typing* an einer Sammlung von *Neisseria meningitidis* Isolaten an, die im Vorfeld mittels MLEE typisiert worden waren (MAIDEN *et al.* 1998). Seither sind mehr als 30 verschiedene Schemata für die Typisierung einer Vielzahl von pathogenen Bakterien und mittlerweile sogar Eukaryoten entwickelt worden (z.B.: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* u.a.) (URWIN und MAIDEN 2003; COOPER und FEIL 2004, MAIDEN 2006). Bei MLST handelt es sich um

eine Typisierungsmethode, die im Gegensatz zu vielen anderen Methoden eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Daten können in Form von DNA-Sequenzen mit Ergebnissen anderer Studien über das Internet verglichen und jedermann zugänglich gemacht werden. Globale Datenbanken der einzelnen Organismen ermöglichen einen Abgleich von Sequenzen (MAIDEN *et al.* 1998; AANENSEN und SPRATT 2005; <http://pubmlst.org/>, http://mlstdb.hku.hk:14206/MLST_index.html, <http://www.mlst.net/>, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/>, <http://mlst.ucc.ie/>). Auf diese Weise können nicht nur Stämme aus lokalen Krankheits-Ausbrüchen dem Infektionsherd zugeordnet werden, sondern es kann auch global festgestellt werden, wie Stämme, die in einer bestimmten Region als Krankheitserreger in Erscheinung treten, mit denen, die weltweit isoliert werden, verwandt sind. Wie auch MLEE basiert MLST auf dem Konzept, die Variation in mehreren selektionsneutralen Loci zu bestimmen (ENRIGHT und SPRATT 1999). Hierzu werden - je nach Spezies - von vier bis acht *housekeeping*-Genen die Sequenzen von zentral gelegenen, 450 – 500 Basenpaaren großen Abschnitten in beide Strangrichtungen bestimmt. Diese Gene gehören zum Kern-Genom, das allen Stämmen einer Bakterien-Spezies gemein ist. Sie sind für grundlegende Zellfunktionen zuständig und hochkonserviert. Von den Genen anderer verwandter Spezies unterscheiden sie sich aber signifikant, so dass sie für die Untersuchung der Evolution innerhalb einer Spezies und als Grundlage von phylogenetischen Bäumen geeignet sind. Für die Typisierung von Salmonellen mittels MLST wurden in den vergangenen Jahren drei verschiedene Ansätze für unterschiedliche *housekeeping* Gene in variabler Anzahl etabliert (KOTETISHVILI *et al.* 2002; SUKHNANAND *et al.* 2005, KIDGELL *et al.* 2002). KIDGELL *et al.* haben 2002 Abschnitte der sieben Gene *aroC* (Chorismate Synthase), *dnaN* (DNA Polymerase III Beta Untereinheit), *hemD* (Uroporphyrinogen III Cosynthase), *hisD* (Histidinol Dehydrogenase), *purE* (Phosphoribosylaminoimidazol Dehydrogenase), *sucA* (Alpha-Ketoglutarat Dehydrogenase) und *thrA* (Aspartokinase+Homoserin Dehydrogenase) aus dem Genom von *S. Typhi* CT18 (PARKHILL *et al.* 2001) ausgewählt, die die Voraussetzungen erfüllen, dass sie sich verstreut auf dem Chromosom befinden (Abb. 4), von Genen flankiert werden, deren Funktion bekannt ist und die dadurch, dass

sie nur langsam mutieren, konserviert sind (HARBOTTLE *et al.* 2006; KIDGELL *et al.* 2002). Auf Grundlage dieser ermittelten Gene haben sie ein MLST-Schema etabliert, das mittlerweile weltweit für die Typisierung von *Salmonellen* angewandt wird (TORPDAHL *et al.* 2005).

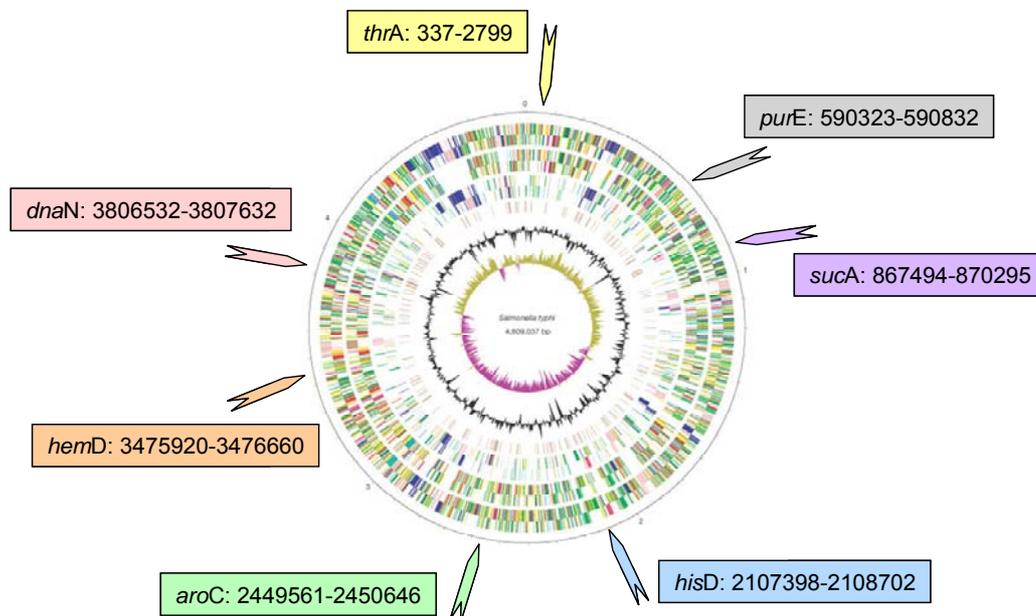


Abbildung 4: Lokalisierung der für MLST untersuchten Gene im *Salmonella*-Genom. Das Genom von *S. Typhi* CT18 (PARKHILL *et al.* 2001) wurde für die Auswahl der sieben *housekeeping* Gene genutzt (KIDGELL *et al.* 2002). Die äußere Markierung zeigt die Megabasen an (insgesamt 4 809 037 bp). Ringe 1 – 9 (von außen nach innen): Ringe 1 und 2 stellen die Gene auf dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Strang an, Ringe 3 und 4: Gene, die mit *E. coli* konserviert sind, Ringe 5 und 6: Gene, die in Bezug auf *E. coli* einzig in *S. Typhi* vorkommen, Ring 7: Pseudogene, Ring 8: G+C Gehalt, Ring 9: GC Bias (G-C/G+C)

Die Sequenzen der sieben Genabschnitte werden über das Internet mit der zentralen Datenbank des *Environmental Research Institute* in Cork (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) abgeglichen und mit der Nummer des entsprechenden Allels versehen. Die Anzahl der Basenpaare, in denen sich einzelne Allele von einander unterscheiden, ist nicht ausschlaggebend für den Grad der Verwandtschaft – die Allele erhalten unterschiedliche Nummern, unabhängig davon, ob sie sich in einem oder mehreren Basenpaaren voneinander unterscheiden. Das liegt daran, dass Allele, die sich aufgrund eines einzelnen Rekombinations-Ereignisses in mehreren Nukleotiden voneinander unterscheiden, nicht weiter entfernt vom Ursprung sind als solche, bei denen eine Punktmutation nur ein einzelnes Basenpaar verändert hat. Der Sequenztyp (ST) wird anhand der Kombination der sieben

Allele ermittelt. Stämme mit gleicher Allelkombination gehören dem gleichen Sequenztyp an. Sequenztypen, die nur in einem Allel voneinander abweichen, werden *Single Locus Variants* (SLVs) genannt, solche mit zwei unterschiedlichen Allelen *Double Locus Variants* (DLVs) bzw. *Triple Locus Variants* (TLVs), wenn sich drei Allele unterscheiden. Auf Basis des Allelprofils von MLST-typisierten Isolaten werden diejenigen Isolate, die genetisch sehr eng verwandt sind, zu klonalen Komplexen oder Gruppen zusammengefasst. Auf diese Art können eventuell Unterschiede in der Wirts-Präferenz oder dem Virulenz-Potenzial bei menschlichen Infektionen aufgedeckt werden, die den einzelnen Komplexen gemein sein können (COOPER und FEIL 2004). Für die Auswertung von MLST-Daten bieten sich verschiedene Computerprogramme an, wie z.B. BioNumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien), das die Möglichkeit bietet, einen *Minimum Spanning Tree* zu berechnen und somit die Verwandtschaft der untersuchten Stämme grafisch darzustellen und zu studieren (Abb. 5).

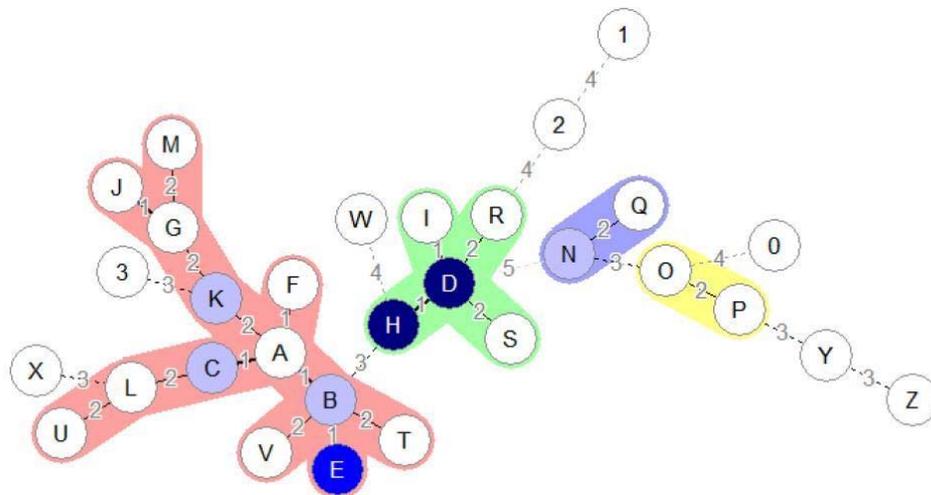


Abbildung 5: Beispiel eines *Minimum spanning trees* in BioNumerics. Jeder Kreis repräsentiert einen ST. Farblich miteinander verbundene STs gehören einer Gruppe bzw. einem klonalen Komplex an. Die Linien zwischen den einzelnen Kreisen repräsentieren den Abstand eines STs zum benachbarten ST: fett gedruckte Verbindungslinie verdeutlichen, dass es sich um SLVs, einfache durchgezogene Linien, dass es sich um DLVs handelt. Gestrichelte Linien stehen für *Triple Locus Variants* (TLVs) bzw. deuten auf vier unterschiedliche Allele der benachbarten STs hin. Zusätzlich gibt der Zahlenwert an der Linie an, in wie vielen der 7 Allele ein ST im Vergleich zum benachbarten ST abweicht. Die Größe und die farbliche Füllung der Kreise gibt Auskunft über die Anzahl von Stämmen mit dem gleichen ST im Datensatz. (Quelle: APPLIED MATHS NV 2008)

1.3.8. Evolution von Bakterien

Für den klassischen Ansatz der Systematik wurden morphologische und physiologische Eigenschaften verschiedener Organismen miteinander verglichen. Die moderne Systematik umfasst durch den Vergleich von DNA zudem die Rekonstruktion der Stammesgeschichte der Organismen (Phylogenie) sowie die Erforschung der Prozesse, die zu der Vielfalt an Organismen führen (Evolutionbiologie). Aufgrund von 16S-rDNA Sequenzierungen konnte beispielsweise entdeckt werden, dass zwischen zwei morphologisch und physiologisch so verschiedenen Bakterien wie *Escherichia coli* und einem Cyanobacterium viel höhere Sequenzhomologien vorliegen, als zwischen *E. coli* und einem formgleichen *Methanobacterium* (SCHLEGEL 1992). Innerhalb einer taxonomischen Gruppe wie der der enterischen Bakterien gibt es eine bemerkenswert große Diversität an Phänotypen. Obwohl sie unzählige Eigenschaften teilen, die auf ihre gemeinsamen Vorfahren hindeuten, besitzt jede Spezies eigene physiologische Charakteristika, die für das Überleben in den jeweiligen ökologischen Nischen benötigt werden. Verschiedene Mechanismen haben zu der Differenzierung der verschiedenen Spezies geführt. Punktmutationen führen zu Modifikationen oder Inaktivierungen verschiedener Gene, die häufig nachteilig oder sogar tödlich für die Zelle sind, sich aber auch neutral hinsichtlich der Lebensfähigkeit oder sogar vorteilhaft auswirken können und dann einer positiven Selektion unterliegen. Allerdings können die phänotypischen Unterschiede zwischen den nah verwandten Arten *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* nicht ausschließlich auf Punktmutationen zurückgeführt werden (OCHMAN *et al.* 2000). Früher herrschte die Meinung vor, dass die Evolution von Prokaryoten durch die Klonalität und periodische Selektion bestimmt sei. Auftretende Mutationen wären demnach die einzige Möglichkeit für Bakterien, sich einen eventuellen Selektionsvorteil zu verschaffen. Mittlerweile haben Untersuchungen die eminente Rolle der homologen Rekombination und des horizontalen Gentransfers in der Evolution von Prokaryoten bewiesen (GOGARTEN *et al.* 2002). Während Mutationen neue Allele von Genen hervorbringen, sorgt die Rekombination für eine Neukombination der veränderten Erbanlagen miteinander, was entweder durch Transformation (die Aufnahme freier DNA,

die nach Lysis einer anderen Zelle übrig geblieben ist), Transduktion (DNA-Abschnitte werden durch Bacteriophagen von einer Zelle zur nächsten transportiert) oder Konjugation (Übertragung von Teilen des Genoms einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle) geschieht. In besonders klonalen Spezies kommt dies nur mit einer sehr geringen Frequenz vor, wohingegen sich nicht-klonale Spezies durch eine große Anzahl von Rekombinations-Ereignissen entwickeln (FRASER *et al.* 2005). Besonders die mittlerweile immer zahlreicher zur Verfügung stehenden MLST-Daten zeigen deutlich, wie häufig bei vielen Bakterien wie beispielsweise *Helicobacter pylori* (ACHTMAN *et al.* 1999) homologe Rekombination und nicht eine schrittweise Akkumulation von Mutationen für den Großteil der Sequenzunterschiede zwischen einzelnen Isolaten verantwortlich ist. Bakterien-Genome weisen daher häufig eine sehr mosaikartige Struktur auf, die aus einem Kern-Genom und einem flexiblen Pool an Genen besteht. Die zu den Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* gehörenden Stämme teilen sich ein Kern-Genom (ANJUM *et al.* 2005). Darüber hinaus kann der Gen-Gehalt allerdings sehr variabel sein: die Genom-Größe für *S. Typhi*-Isolate kann um bis zu 20 % variieren (THONG *et al.* 1997). Verschiedene Untersuchungen an Salmonellen haben gezeigt, dass homologe Rekombination die Hauptursache für Variationen innerhalb der *housekeeping* Gene ist und dass das Maß an Klonalität innerhalb der Subspezies I gering ist (BROWN *et al.* 2003; OCTAVIA und LAN 2006; FALUSH *et al.* 2006). Eine Ausnahme bildet der Serotyp *Salmonella Typhi*, der nur ein geringes Maß an Nukleotid-Diversität aufweist (ROUMAGNAC *et al.* 2006; KIDGELL *et al.* 2002).

1.3.9. Pathogenität von Salmonellen

Infektionen mit *Salmonella* Serotypen können prinzipiell drei verschiedene klinische Symptome hervorrufen, wie Bakteriämie, Typhus und Gastroenteritis (ZHANG *et al.* 2003). Verschiedene Virulenzmechanismen sind für die Adhäsion, Invasion, dem fakultativ intrazellulärem Parasitismus und die Toxinbildung (Enterotoxin) verantwortlich. Die Bakterien müssen das stark saure Milieu des Magens überleben (COTTER und DIRITA 2000), bevor sie sich im Dünndarm an die Zellen des Intestinalgewebes anheften und in

diese eindringen. Invasive Salmonellen, die systemische Allgemeininfektionen hervorrufen können, müssen außerdem im Blut überleben und sich in Makrophagen der Leber und Milz vermehren können (GROISMAN und OCHMAN 1997). Zunächst heften sich Salmonellen mit Hilfe von Fimbrien an Dünndarm-Epithelzellen des Wirtes an (Adhärenz). Ihre Zielzellen sind je nach Wirtsspezifität insbesondere Enterocyten oder M-Zellen innerhalb der Peyerschen Plaques (FROST *et al.* 1997). M-Zellen sind spezialisierte Zellen, deren Hauptfunktion darin liegt, Antigene aus dem Darmlumen zu ihrer basolateralen Membran zu transportieren, wo die Antigene von lymphoidalen Zellen übernommen werden (OHL und MILLER 2001). *S. Typhimurium* verfügt über eine Vielzahl verschiedener Fimbrien, die bei Salmonellen über die ganze Zelloberfläche verteilt sind und die Adhäsion ermöglichen (DARWIN und MILLER 1999). Durch die Adhäsion wird ein so genanntes *membrane ruffling* induziert (OHL und MILLER 2001): die Transkriptionsprodukte des *invE*-Lokus bewirken in den Zielzellen einen Einstrom von Ca^{2+} - Ionen aus dem Darmlumen, wodurch eine Polymerisierung von Actin zu Mikrofilamenten induziert wird (KLEER 2003). Die Membranen von M-Zellen und Enterozyten werden ausgestülpt und die Bakterien dadurch schließlich in die Zellen aufgenommen (Invasion), wo sie in phagozytischen Vesikeln lokalisiert werden (WALLIS und GALYOV 2000). Die Bakterien vermehren sich in den Vesikeln und gelangen in ihnen in die immunaktive Schicht der Darmwand, wo sie von Phagozyten aufgenommen werden (KLEER 2003, SCHAREK und TEDIN 2007). Ist die Phagozytose und die Aktivität der Makrophagen an dieser Stelle nicht effektiv, kann es zur extraintestinalen, systemischen Ausbreitung in weitere lymphoide Organe wie mesenteriale Lymphknoten und die Milz kommen, so dass die Salmonelleninfektion einen schweren oder persistierenden Verlauf nimmt (SCHAREK und TEDIN 2007). Wenigstens 60 Gene werden für die Pathogenität von *Salmonella enterica* benötigt (COTTER und DiRITA 2000). Viele dieser Gene sind bereits in nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen vorhanden. Darüber hinaus sind für die Virulenz von Salmonellen Gene verantwortlich, die in nicht-pathogenen Mikroorganismen fehlen. Davon sind einige plasmidkodiert. Die Mehrzahl befindet sich in den so genannten Pathogenitätsinseln, die bei Salmonellen SPI (= *Salmonella Pathogenicity*

Island) genannt werden. Es handelt sich um große Cluster von Virulenz-Genen, die sich in nicht-pathogenen Arten nicht finden lassen und häufig eine Bedeutung für spezifische Interaktionen mit den Wirtszellen, wie der Invasion und intrazellulärer Pathogenität haben (GROISMAN und OCHMAN 1997). Mittlerweile wurden 12 SPI beschrieben, die sich an verschiedenen Stellen des *Salmonella*-Genoms befinden und die sich in Größe und Funktion unterscheiden (HENSEL 2004). SPI-1 und SPI-5 kodieren beispielsweise für Gene, die bei der Invasion der Erreger in die Darmepithelzellen eine Rolle spielen. SPI-1 kodiert mehr als 30 Proteine, zu denen regulatorische Proteine und strukturelle Komponenten eines Typ III Sekretionssystems (T3SS) gehören. Dieses Sekretionssystem ermöglicht es den Bakterien nach Aufnahme des Wirtszellenkontaktes, Effektorproteine, deren Gene sich an verschiedenen Stellen des *Salmonella* Genoms befinden, direkt in das Zytosol der Wirtszelle zu translozieren (GALAN 2001). Einige dieser Virulenz-assoziiierter Effektorproteine, die über das SP-1 T3SS transloziert werden (PRAGER *et al.* 2000) und als Sop (*Salmonella outer proteins*) bezeichnet werden (WALLIS und GALYOV 2000), sind mit ihren Virulenzfunktionen in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Die Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA, die durch das *Salmonella* SP-1 T3SS transloziert werden und ihre Funktion im Infektionsprozess

Effektor	Funktion	Referenz
AvrA	Unterdrückung der inflammatorischen Immunantwort, löst zelluläre Apoptose aus; kodiert innerhalb von SPI-1	COLLIER-HYAMS <i>et al.</i> 2002, BEN-BARAK <i>et al.</i> 2006, PRAGER <i>et al.</i> 2000
SopB	Inositolphosphat- Phosphatase, die zu einer erhöhten Cl ⁻ -Sekretion führt und somit den Flüssigkeitsausfluss induziert (Gastroenteritis), kodiert innerhalb von SPI-5	NORRIS <i>et al.</i> 1998, PRAGER <i>et al.</i> 2000, WALLIS und GALYOV 2000, WOLF 2004
SopD	Konzertierte Aktion mit SopB; Induktion des Flüssigkeitsverlustes (Gastroenteritis)	BAKOWSKI <i>et al.</i> 2007, STRECKEL <i>et al.</i> 2004
SopE1	Induktion des <i>membrane ruffling</i> (Modellierung des Aktin- Zytoskellets) → Invasion der Bakterien in die Wirtszellen; Phagen-kodiert	PRAGER <i>et al.</i> 2000, SCHLUMBERGER und HARDT 2006, RAHMAN <i>et al.</i> 2004
SopE2	Induktion des <i>membrane ruffling</i> (Modellierung des Aktin- Zytoskellets) → Invasion der Bakterien in die Wirtszellen	SCHLUMBERGER und HARDT 2006, RAHMAN <i>et al.</i> 2004

1.4. Zielsetzung und Problemstellung

Im ländlichen Benin haben die Bewohner der Dörfer nur sehr eingeschränkt Zugang zu sicherem Trinkwasser. Mehr als 70 % aller Wasserstellen im oberen Ouémé Einzugsgebiet sind durch *E. coli*, dem Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen des Wassers, kontaminiert. Zunächst bestand die Aufgabe der vorliegenden Arbeit in der Detektion von Fäkalkeimen wie *Escherichia coli* und Salmonellen und der Bestimmung der mittleren Kontaminationsrate aller im Beobachtungsgebiet aufgefundenen Wasserstellen. Enteritische Salmonellen konnten bislang im Gegensatz zu anderen pathogenen Bakterien wie *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei* (YODER *et al.* 2008, WHO 2008a, KOUTSOTOLI *et al.* 2006) oder typhösen Salmonellen (RAM *et al.* 2007, KLEER 2003) nur selten mit den Ausbrüchen von wassergebundenen Infektionserkrankungen in Verbindung gebracht werden (s. 1.3.5). Da das pathogene Potenzial der aus Umweltproben isolierten Stämme unbekannt ist, sollten verschiedene Pathogenitätsfaktoren mittels PCR auf DNA-Ebene und die Expression der Effektorproteine mit der von STRECKEL *et al.* (2004) beschriebenen Methode überprüft werden. Die Bestimmung von Salmonellen-Serotypen ist einerseits aus Gründen der unterschiedlichen Pathogenität (Typhus, Gastroenteritis), andererseits zur Identifizierung von Infektionsquellen und zum Aufspüren von Infektionsketten erforderlich. Hierfür ist das Vorhalten einer großen Vielzahl verschiedener Antikörperseren notwendig, deren Herstellung und Qualitätskontrolle sehr kompliziert und zeitintensiv bzw. deren Anschaffung sehr kostenaufwendig ist. Während in Deutschland am häufigsten Serotypen wie *S. Enteritidis* (ca. 65 %) und *S. Typhimurium* (ca. 23 %) vorkommen (HARTUNG 2002), rechtfertigen selten vorkommende Serovaren den Aufwand für diese nur in nationalen Referenzzentren durchgeführte Diagnostik nicht. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit, die isolierten *Salmonella*-Stämme alternativ zur Serotypisierung mit der molekularbiologische Differenzierungsmethode *Multilocus-sequence-typing* (MLST) zu untersuchen. Diese DNA-basierte Methode bietet über die Typisierung hinaus die Möglichkeit, die Populationsstruktur der beninischen Isolate zu ermitteln und sie mit Stämmen einer global angelegten Datenbank abzugleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Das Untersuchungsgebiet

Das obere Ouémé Einzugsgebiet befindet sich in Zentral-Benin (9° - 10° nördlicher Breite und 1°30' - 2°45' östlicher Länge) in den Departements Donga und Borgou und hat eine Fläche von ca. 14 366 km². In der von Mai bis Oktober andauernden Regenzeit fällt eine durchschnittliche Niederschlagsmenge von 1 150 mm (Mess-Station Parakou) und die Jahres-Durchschnitts-Temperatur beträgt 26,8°C (MULINDABIGWI 2008). Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Wasseruntersuchungen wurden in einem Untersuchungsgebiet durchgeführt, das nicht das gesamte obere Ouémé Einzugsgebiet umfasst, sondern sich auf das Dreieck zwischen den Städten Parakou, Bassila und Djougou (Abb. 3) konzentriert. In diesem ländlichen Gebiet befinden sich ca. 120 Dörfer mit insgesamt ungefähr 160 000 Einwohnern verschiedener Ethnien wie Dendi, Bariba, Yom, Yoruba und Lokpa (HELDMANN 2008a), die sich in erster Linie entlang der Hauptstraßen angesiedelt haben. Um einen Überblick über die Situation der Trinkwasserversorgung und -hygiene in der Region zu erhalten, wurde im Projektrahmen neben der Erstellung einer detaillierten Brunnendatenbank und einer Latrinendatenbank in den Jahren 2007 - 2008 auch eine Umfrage der Wasserkonsumenten durchgeführt. Die im folgenden beschriebenen Wasseranalysen wurden in dem im Jahr 2001 in der Stadt Parakou aufgebautem *Laboratoire d'Analyses des Eaux IMPETUS* (SAUTER 2006) durchgeführt.

2.1.1. Die Brunnendatenbank

Eine Datenbank, die Beschreibungen und Informationen (Erbauungsjahr, Tiefe, Durchmesser), GPS-Koordinaten, Analyse-Ergebnisse und Fotos aller sich im Untersuchungsgebiet befindenden Wasserstellen enthält (MAZOU *et al.* 2008), wurde seit 2003 kontinuierlich aktualisiert, da Änderungen der Wasserversorgung in den untersuchten Dörfern beobachtet wurden. Im Laufe der Jahre sind viele der registrierten

Wasserstellen aufgrund von Austrocknung und Versandung in den Trockenzeiten nicht mehr genutzt worden und es sind viele neue Wasserstellen entstanden. Um den vollständigen Datensatz auf den aktuellsten Stand zu bringen, wurde von 2007 – 2008 eine systematische Neuauflage der Brunnendatenbank durchgeführt. Die Brunnendatenbank diente der Planung und Durchführung der Probennahme und Messungen in den verschiedenen Dörfern.

2.1.2 Die Latrinendatenbank

Eine Bewertung der Risiken, die ausgehend von den registrierten Wasserstellen, war letztlich nur durch Ermittlung der Situation der Abwasserhygiene und sanitären Einrichtungen sowie der Aufnahme potenzieller Kontaminationsquellen in die Datenbank möglich. Daher wurden zusätzlich die Standorte, Zustandsbeschreibungen und Fotos aller Latrinen in 56 Dörfern erfasst. In Kombination mit der Brunnendatenbank und den Analyseergebnissen ergibt sich ein detaillierteres Bild der Infektionsrisiken.

2.1.3 Befragungen der Wasserkonsumenten

Ergänzend zu den Wasseranalysen wurde die subjektive Sicht der Konsumenten in Form einer Umfrage in 23 repräsentativen Dörfern ermittelt. Ausgewählte Vertreter wie der Dorfchef, Frauengruppen, Gesundheitsbeauftragte oder Trinkwasser-Komitees, wurden zu ihrer Sicht der Situation der Trinkwasserversorgung und –qualität in ihrem Dorf befragt (Fragebogen siehe Anhang 11.1).

2.2. Wasser-Beprobungen

Vom IMPETUS-Labor in Parakou ausgehend wurde jährlich eine möglichst große Anzahl von Dörfern beprobt, wobei mit den Dörfern entlang der Straße von Parakou nach Djougou begonnen wurde. Anschließend folgten die Dörfer entlang der Straße von Djougou nach Bassila und schließlich die an der Piste von Oubérou nach Bassila gelegenen

Ortschaften. Sehr entlegene Orte wurden seit 2003 allerdings nur selten aufgesucht, da aufgrund der weiten Anfahrt eine Weiterbearbeitung der Wasserproben innerhalb weniger Stunden nach der Probennahme im Labor in Parakou nicht gewährleistet werden konnte. Die zu beprobenden Wasserstellen wurden mit Hilfe ihrer GPS-Koordinaten aufgesucht, die in der Brunnendatenbank gespeichert sind. Wasserproben wurde mit autoklavierten 250 ml-Schott Duran Flaschen, die an einer Kordel befestigt wurden, aus den offenen Brunnen entnommen (Abb. 6 a). Die Kordel wurde vor jeder Beprobung mit 70 % Ethanol desinfiziert. Für die Beprobung geschlossener Pumpen-Systeme wurden ebenfalls sterile 250 ml Schott Duran Flaschen verwendet. Vor der Probennahme wurde das Wasser einige Minuten ablaufen gelassen und die Armaturen zur Beseitigung von Kontaminationen aus der Probennahme-Öffnung abgeflammt (Abb. 6 b). Bei jeder Beprobung wurden Temperatur, elektrische Leitfähigkeit und pH-Wert der Wasserprobe mit Hilfe eines transportablen Kombitesters (Fa. Hanna Instruments) vor Ort bestimmt. Die Wasserproben wurden in gekühlten Transportbehältern gelagert, in Tagesfrist in das IMPETUS-Labor nach Parakou transportiert und auf den primären Kulturmedien angelegt.



Abbildung 6: **a)** Wasserentnahme aus einem Tonkrug zur Wasserlagerung (*Jarre*) mit einer sterilen Duran Flasche. **b)** Farouk Mazou flammt vor Entnahme der Wasserprobe den Hahn einer Pumpe ab.

2.2.1. Untersuchungen in ausgewählten Dörfern

Da zu vermuten war, dass die Wasserqualität offener Wasserstellen im Unterschied zu rohrgeführten Wassersystemen den jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, wurden ausgewählte, repräsentative Dörfer

(Kpawa, Kaki Koka, Kpessou, Vanhoui und Tiranga) von Dezember 2004 bis September 2006 mehrfach im Jahresverlauf analysiert. Als Kriterien der Repräsentativität galten die Erreichbarkeit, die Gesamtanzahl von Wasserstellen und die Verteilung verschiedener Arten von Wasserquellen.

2.3. Bakteriologische Wasseruntersuchungen

Die Primäranlage der gekühlt transportierten Proben erfolgte maximal sechs Stunden nach Probennahme in Anreicherungsbouillons bzw. auf Selektivnährböden. Für die Anreicherung von Salmonellen und den Nachweis von *E. coli* stehen im IMPETUS-Labor in Parakou verschiedene Nährmedien und Anreicherungs-Bouillons der Firmen Oxoid (Wesel) und Sifin (Berlin) zur Verfügung. Sämtliche Nährmedien wurden vor Ort mit demineralisiertem Wasser (Umkehrosiose-Anlage RO 103 TDS, Fa. Kleinhens Wassertechnik) hergestellt.

2.3.1. Nachweis des Fäkalindikators *Escherichia coli*

Die Bestimmungen von *E. coli* und coliformen Bakterien umfasste neben der Speziesdiagnostik auch deren Quantifizierung. Hierfür wurden 0,5 ml der jeweiligen Wasserprobe direkt auf Chromagar-Platten (*Chromogenic E. coli/coliform Agar*, Fa. Oxoid, Wesel) pipettiert, mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und ca. 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Speziesanalyse fand zunächst ein Anreicherungsschritt statt: 1 ml der Wasserprobe wurde in 5 ml Lactose Bouillon (Fa. Oxoid, Wesel) überimpft und nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht auf Chromagar-Platten ausplattiert und weitere 24 h inkubiert. Die Kolonien von *E. coli* erscheinen auf diesem chromogenen Agar in einer charakteristischen violetten Färbung, coliforme Bakterien bilden rosa-farbige Kolonien und andere Gram-negative Bakterien bleiben farblos.

2.3.2. Anreicherung und Isolierung von Salmonellen aus Wasser

Standardmäßig wurden für den qualitativen Nachweis von Salmonellen zunächst zur Anreicherung 5 ml Rappaport-Vassiliadis-Bouillon

(Fa. Oxoid, Wesel) und 5 ml Selenit-Bouillon (Fa. Sifin, Berlin) jeweils mit 1 ml der Wasserprobe beimpft und für 24 h bei 37°C inkubiert. Mit dem Dreistrich-Verfahren wurden die Ansätze am nächsten Tag fraktioniert jeweils auf Hektoen- und XLD-Selektiv-Nährböden (Fa. Oxoid, Wesel) ausgestrichen und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Verdächtige schwarze Kolonien (Abb. 7) wurden zur Überprüfung ihrer biochemischen Eigenschaften auf folgende Nährböden überimpft:

- Dreizucker-Eisen Klilger-Agar (Fa. Oxoid, Wesel)
- Harnstoff-Agar (Fa. Oxoid, Wesel)
- LIM-Agar (Fa. Sifin, Berlin)

Kolonien, die nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C die für Salmonellen typischen biochemische Eigenschaften aufwiesen, wurden in 2 ml-Schraubdeckelröhren mit Cary-Blair-Transportmedium (Fa. Oxoid, Wesel) überimpft und parallel als Glycerinkultur nach 12 h Inkubation bei 37°C eingefroren. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden diese Proben dann ins Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene nach Köln geschickt, wo mit dem Analyseautomaten VITEK2 (Fa. BioMérieux) eine erneute Bestimmung der biochemischen Eigenschaften stattfand.



Abbildung 7: *Salmonella*-Kolonien auf XLD-Agar

2.3.3. Isolierung von Salmonellen aus Stuhlproben

In dieser Arbeit sind neben *Salmonella* Isolaten aus Wasser auch 18 Isolate aus Stuhlproben untersucht worden. Von Oktober 2003 bis Januar 2004 wurden zunächst Wasseranalysen aller Trinkwasserquellen des an der

Straße von Parakou nach Djougou gelegenen Dorfes Kaki Koka durchgeführt und in einer Parallelbestimmung ca. 370 Stuhlproben der Dorfbewohner auf das gleichzeitige Vorkommen von Salmonellen untersucht (JOST, unveröffentlichte Daten). Diese Feldkampagne wurde im Zeitraum von April bis Juni 2008 in dem gleichen Dorf wiederholt. In der Zeit wurden alle Wasserstellen des Dorfes und Stuhlproben von 201 Einwohnern, wie von ZOBEL (2008) und KRÖGER (2008) beschrieben, erneut untersucht. Im Verlauf dieser Studie wurden jeweils sämtliche auf den Primäranlageplatten erschienenen Einzelkolonien subkultiviert und weiterverarbeitet, um Mehrfachkontaminationen mit unterschiedlichen Salmonellen-Serotypen zu erfassen.

2.3.4. Serotypisierung

Zur Bestimmung der Serotypen wurden die isolierten Salmonellen zum Hygiene Institut Hamburg oder zum Nationalen Referenzzentrum für Enteritiserreger am Robert Koch Institut nach Wernigerode gesandt. Isolate mit bisher unbekannter Antigenformel wurden zur Bestätigung zum *Centre National de Référence des Salmonella* am *Institut Pasteur* nach Paris weitergeleitet.

2.3.5. Bestimmung der Antibiotika-Resistenzen

Neben der Isolat-Identifizierung und -Typisierung wurde die Sensibilität der Salmonellen aus den Umwelt- und Stuhlproben ausgetestet. Die Antibiotika-Resistenzen der Stämme wurde mit Hilfe der VITEK2-Testkarten für die Empfindlichkeitsprüfung (AST-N062, Fa. BioMérieux) in dem Analyseautomaten VITEK2 bestimmt. Folgende Antibiotika wurden untersucht: Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefazolin, Cefotaxime, Cefpodoxime, Ceftazidime, Cefuroxime, Cefuroxime Axetil, Ciprofloxacin, BSBL, Gentamicin, Imipenem, Levofloxacin, Meropenem, Nitrofurantoin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam, Tetracycline, Tobramycin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

2.3.6. Stammsammlung

Die Stammsammlung von beninischen Umweltsalmonellen wurde in regelmäßigen Abständen von ca. 4 Wochen auf Blutagar-Platten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Drei Kopien der Sammlung wurden als Glycerinkulturen bei -70°C tiefgekühlt.

2.4. *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

Die Typisierung der beninischen *Salmonella*-Isolate wurde nach dem zuvor von KIDGELL *et al.* (2002), TORPDAHL *et al.* (2005) und HARBOTTLE *et al.* (2006) beschriebenen MLST-Schema durchgeführt (Abb. 8). Für die PCR-Reaktion wurden Primer und Bedingungen entsprechend des auf der Website der *Salmonella enterica* MLST Datenbank (http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html) beschriebenen Protokolls verwendet.

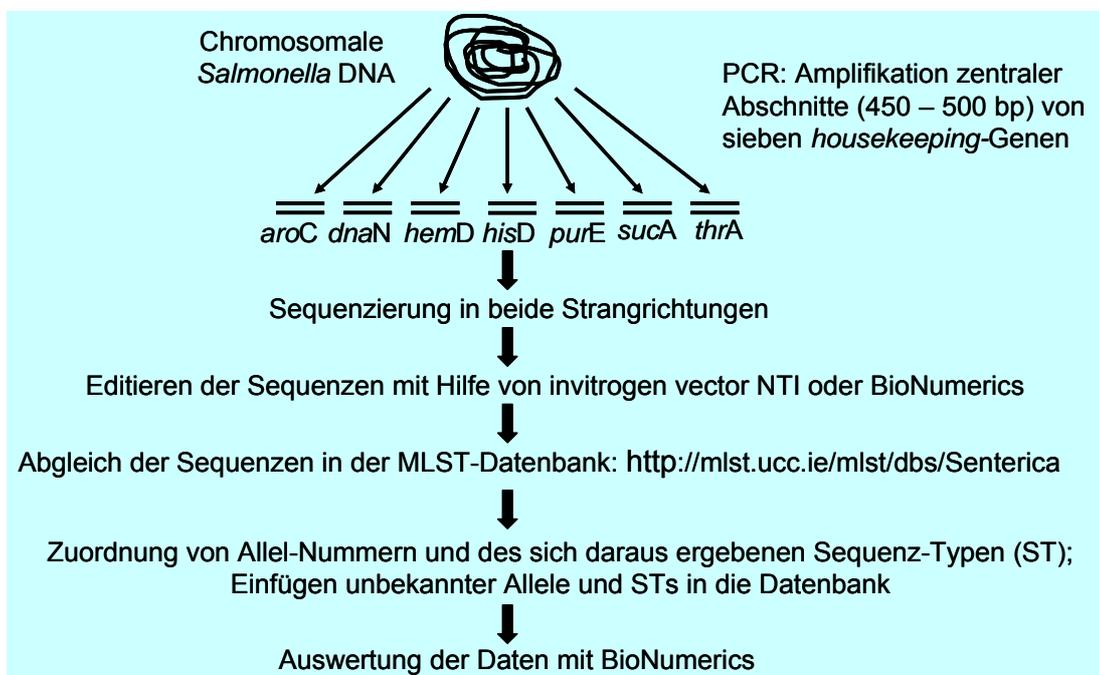


Abbildung 8: Schematische Darstellung der MLST-Methode nach FEIL *et al.* (2001)

2.4.1. DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung wurden die Salmonellen über Nacht in 5 ml LB-Bouillon (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1000 ml) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte mit dem Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden).

Alternativ wurde auf den Schritt der DNA-Isolierung verzichtet und direkte Kolonie-PCRs durchgeführt: Material einer Einzelkolonie wurde in 0,5 ml physiologischer NaCl-Lsg. (0,85 % ig) aufgelöst und davon jeweils 1 µl pro PCR-Ansatz eingesetzt.

2.4.2. In vitro Amplifikation von DNA durch PCR

Für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurde anfänglich isolierte DNA der zu untersuchenden Stämme als *template* eingesetzt. Für später durchgeführte Reaktionen erwiesen sich direkte Kolonie-PCRs als praktikabler (s. 2.4.1).

PCR-Ansatz: Σ 30 µl:

- 12 µl H₂O_{bidest.}
- 15 µl MasterMix (Fa. Eppendorf)
- 1 µl Template DNA, bzw. Bakteriensuspension
- 1 µl Vorwärts-Primer (100 ng/µl)
- 1 µl Rückwärts-Primer (100 ng/µl)

Nach einem ersten Denaturierungsschritt von 5 Minuten für 95°C, wurden 45 Zyklen nach folgendem Muster durchlaufen:

Denaturierung:	95°C, 1 min.
Anlagerung der Oligonukleotide:	55°C, 1 min.
Elongation:	72°C, 2 min.

Nach Ablauf der Zyklen folgte eine Abkühlung auf 4°C.

Tabelle 5: Für die MLST-Analyse verwendete Primer.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Produktlänge (bp)
PCR-Primer*		
<i>aroC</i> _F	5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3'	826
<i>aroC</i> _R	5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'	
<i>dnaN</i> _F	5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3'	833
<i>dnaN</i> _R	5'-AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC-3'	

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz	Produktlänge (bp)
<i>hemD</i> _F	5'-ATGAGTATTCTGATCACCCG-3'	666
<i>hemD</i> _R	5'-ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA-3'	
<i>hisD</i> _F	5'-GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC-3'	894
<i>hisD</i> _R	5'-CTGAACGGTCATCCGTTTCTG-3'	
<i>purE</i> _F	5'-ATGTCTTCCCGCAATAATCC-3'	510
<i>purE</i> _R	5'-TCATAGCGTCCCCGCGGATC-3'	
<i>sucA</i> _F	5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3'	643
<i>sucA</i> _R	5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'	
<i>thrA</i> _F	5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3'	852
<i>thrA</i> _R	5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	
Sequenzier-Primer*		
<i>aroC</i> _S_F	5'-GGCACCAGTATTGGCCTGCT-3'	
<i>aroC</i> _S_R	5'-CATATGCGCCACAATGTGTTG-3'	
<i>dnaN</i> _S_F	5'-CCGATTCTCGGTAACCTGCT-3'	
<i>dnaN</i> _S_R	5'-CCATCCACCAGCTTCGAGGT-3'	
<i>hemD</i> _S_F	5'-GTGGCCTGGAGTTTTCCACT-3'	
<i>hemD</i> _S_R	5'-GACCAATAGCCGACAGCGTAG-3'	
<i>hisD</i> _S_F	5'-GTCGGTCTGTATATCCCGG-3'	
<i>hisD</i> _S_R	5'-GGTAATCGCATCCACCAAATC-3'	
<i>purE</i> _S_F	5'-CGCATTATTCCGGCGCGTGT-3'	
<i>purE</i> _S_R	5'-CGCGGATCGGGATTTTCCAG-3'	
<i>sucA</i> _S_F	5'-AGCACCGAAGAGAAACGCTG-3'	
<i>sucA</i> _S_R	5'-GGTTGTTGATAACGATACGTAC-3'	
<i>thrA</i> _S_F	5'-ATCCCGGCCGATCACATGAT-3'	
<i>thrA</i> _S_R	5'-CTCCAGCAGCCCCTCTTTCAG-3'	

* http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html

2.4.3. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung der DNA-Fragmente

Es wurden 2 %ige Agarosegele zur visuellen Überprüfung der amplifizierten DNA-Fragmente mittels Elektrophorese hergestellt. Dazu wurden zunächst 1,6 g Agarose (Fa. Serva, Heidelberg) in 80 ml 1xTAE-Puffer (40 mM Tris, 40mM Borsäure, 1 mM EDTA) gelöst und nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid ein Gel gegossen. Der 1xTAE-Puffer diente als Elektrophoresepuffer. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die DNA-Proben im Verhältnis 10:1 mit Bromphenolblau-haltigem Ladepuffer (125 mg Bromphenolblau + 12,5 g Ficol + TE- Puffer pH 8,0 ad 50 ml) vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 – 100

Volt und einer Laufzeit von 20 – 60 Minuten. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die DNA-Banden mittels eines UV-Spektrometers detektiert (GelDoc2000, Biorad, München). Als Marker für die linearen DNA-Fragmente wurde die 1 Kb Plus DNA-Ladder (Fa. Invitrogen) eingesetzt.

2.4.4. Aufbereitung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).

2.4.5. Sequenzierung

Die Sequenzierungen der MLST-Gen-Abschnitte wurde am Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) durchgeführt. Jedes PCR-Produkt wurde von beiden komplementären Strängen sequenziert. Für jede Probe wurde der Sequenzier-Ansatz (Σ 6 μ l) folgendermaßen pipettiert:

4,5 μ l H₂O_{bidest.}

1 μ l aufgereinigtes PCR-Produkt

0,5 μ l Sequenzier-Primer (Tab. 5)

2.4.6. Auswertung der DNA-Sequenzen

Die beiden erhaltenen Nukleotidsequenzen der komplementären Stränge jedes Genfragments wurden mit Hilfe der Programme VectorNTI[®] (Fa. Invitrogen) und BioNumerics 5.1 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien) miteinander hybridisiert, visuell kontrolliert und, falls nötig, manuell editiert. Die Analyse der MLST-Daten beinhaltet den Abgleich der editierten Sequenzen mit der *S. enterica* MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>), der Zuordnung der einzelnen Allel-Nummern und der Ermittlung des sich daraus ergebenden Sequenz-Typen. Bislang unbekannte Allele und Stamminformationen über neue STs, die Informationen wie Stammbezeichnung, Subspezies, Serotyp, Isolierungsjahr, Quelle, Herkunftsland und Kontinent enthielten, wurden in die Datenbank eingefügt. Neue Allele wurden nach Revision durch den Kurator Prof. Achtman und gegebenenfalls erneut sequenziert.

Abschnittes als Referenz-Allele in die Datenbank eingefügt. Die Auswertung und Übermittlung der Daten fand sowohl über das Internet als auch direkt am *Environmental Research Institute* des *University College Cork* statt. Mit dem Computerprogramm BioNumerics 5.1 war es möglich, die MLST-Daten in Form eines *Minimum Spanning Trees* darzustellen, um Aussagen über die Populationsstruktur der *Salmonella*-Isolate machen zu können und die Zugehörigkeit der ermittelten STs zu verschiedenen evolutionären Gruppen festzustellen.

2.5. *Salmonella outer proteins* (Sop)

Auf Grundlage der von STRECKEL *et al.* (2004) und PRAGER *et al.* (2003) veröffentlichten Nachweisuntersuchungen der *Salmonella outer proteins* (Sop) und den daraus resultierenden Einteilungen der Stämme in verschiedene pathogene Gruppen (*pathovars*) wurden diese Virulenz-assoziierten Effektorproteine für die beninischen *Salmonella* Isolate untersucht. SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA sollten sowohl mit Hilfe von PCR auf DNA-Ebene, als auch auf Proteinebene durch Expressions-Untersuchungen für insgesamt 62 ausgewählte beninische *Salmonella*-Stämme nachgewiesen werden. Der Expressions-Nachweis von SopB, SopD, SopE1 und SopE2 sowie AvrA wurde am Robert Koch Institut in Wernigerode mit Unterstützung von W. Streckel nach dem von ihr beschriebenen Verfahren durchgeführt (STRECKEL *et al.* 2004).

2.5.1. Nachweis der *sop*-Gene mittels PCR

Die PCR wurde - wie unter 2.3.2 erläutert - mit den von PRAGER *et al.* (2000) beschriebenen Primern durchgeführt (Tab. 6). Negative PCR-Ergebnisse wurden mit Primern für kleinere Abschnitte der untersuchten Virulenz-Gene (KOHLMANN 2008) überprüft. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Virulenzgen-Fragmente wurde statt isolierter DNA eine Bakteriensuspension des jeweiligen zu überprüfenden Stammes in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Tabelle 6: Für den Nachweis der Pathogenitätsfaktoren *sopB*, *sopD*, *sopE1* und *avrA* auf DNA-Ebene verwendete Primer-Paare. Die Anwesenheit von *sopB*, *sopD*, *sopE1* und *avrA* wurde jeweils mit einem zusätzlichen Primerpaar für kleinere Genabschnitte überprüft.

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz*	Produktlänge (bp)
<i>sopB</i> _F*	5'-CAACCGTTCTGGGTAAACAAGAC-3'	1348
<i>sopB</i> _R*	5'-AAGATTGAGCTCCTCTGGCGAT-3'	
<i>sopB</i> _129_F**	5'-AACCGTTCTGGGTAAACAAGAC-3'	129
<i>sopB</i> _129_R**	5'-AGATTTTTCTTCAATGCTTTTGC-3'	
<i>sopD</i> -F*	5'-TGATAGTAAACAGATCTTGATGAGC-3'	289
<i>sopD</i> -R*	5'-TTATGGGAGTCACTTTAAGATTCCGGTAA-3'	
<i>sopD</i> _134_F**	5'-CTTTAAACGGCTACAACATCTGG-3'	134
<i>sopD</i> _134_R**	5'-GGATGTCCTTAATATTGCTTTGG-3'	
<i>sopE1</i> _F*	5'-ACACACTTTCACCGAGGAAGCG-3'	398
<i>sopE1</i> _R*	5'-GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG-3'	
<i>sopE1</i> _175_F**	5'-AACACTGAGTCTTCTGCAACACA-3'	175
<i>sopE1</i> _175_R**	5'-ATAGTATAGCTTCACGGGTCTGG-3'	
<i>sopE2</i> _143_F**	5'-AGTAAAGATCCGGCCTATGCTC-3'	143
<i>sopE2</i> _143_R**	5'-GCAGCCTCTCCTATCTCTTTCA-3'	
<i>avrA</i> -F*	5'-GTTATGGACGGAACGACATCGG-3'	385
<i>avrA</i> -R*	5'-ATTCTGCTTCCCGCCGCC-3'	
<i>avrA</i> _186_F**	5'-CTAAACACCGAAGCATTGACC-3'	186
<i>avrA</i> _186_R**	5'-GGAAACAAGCTCATGGACTGAC -3'	

Quellen: *PRAGER *et al.* 2000, **KOHLMANN 2008

2.5.2. Präparation der *Salmonella outer proteins*

Vorkultur: 5 ml LB-Bouillon + 0,3 M NaCl
wurden mit einer Kolonie beimpft und für 6 h bei 37°C, 100 rpm in einem Winkel von 45° longitudinal inkubiert, bis eine OD von ca. 0,7-0,8 erreicht war

Hauptkultur: 5 ml der Vorkultur wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 15 ml frischem LB + 0,3 M NaCl überführt und bei 37°C, 100 rpm, ü.N. inkubiert.

Präparation der Sop's aus dem Überstand:

- Hauptkultur (20 ml) wurde 30 min. auf Eis inkubiert und danach sofort mind. 1 h bei 20 000 rpm bei 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wurde mit 10 %iger TCA (Tri-Chlor-Essigsäure) für 1 h auf Eis präzipitiert.

- Das Präzipitat wurde anschließend für 1 h bei 20 000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.
- Das Sediment wurde mit 400 µl 0,1 M NaOH überschichtet und vorsichtig vom Boden des Zentrifugen-Röhrchen losgekratzt.
- nach Zugabe von 2 ml eiskaltem Aceton erfolgte eine Inkubationsphase von mindestens 20 min. bei -20°C
- Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 20 000 rpm wurde der Überstand abgegossen und das Sediment über Nacht trocknen gelassen.
- Das getrocknete Sediment wurde in 100 µl Lämmli-Puffer gelöst und bei 95°C für 5 min. gekocht

Lämmli-Puffer: 5 ml Mercaptoethanol
 12,5 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8
 20 ml 10 %iges SDS in H₂O_{bidest.}
 2 mg Bromphenolblau
 ad 50 ml H₂O_{bidest.}

2.5.3. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Es wurden SDS-haltige Polyacrylamid-Gele, bestehend aus einem 10 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel, mit einer Stärke von 0,75 cm hergestellt. Die genaue Zusammensetzung ist dem Pipettierschema in Tab. 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele für die Western-Blot-Analyse

Komponenten	Sammelgel (4 %ig)	Trenngel (10 %ig)
H ₂ O bidest.	3,0 ml	4,15 ml
Tris pH 8,8	-	2,5 ml
Tris pH 6,8	1,25 ml	-
Acryl / Bis - Lösung (30 %ig)	0,6 ml	3,3 ml
APS (1 %ig, frisch)	50,0 µl	50,0 µl
SDS (10 %ig)	50,0 µl	100,0 µl
TEMED	5,0 µl	10,0 µl

Das auspolymerisierte Gel wurde in der Elektrophorese-Kammer (Mini Protean[®] 3 Cell System, BioRad, München) fixiert. Sowohl Anoden- als auch Kathodenraum wurden mit SDS-Elektrophorese-Puffer (6,0 g Tris; 28,8 g Glycerin; 2,0 g SDS ad 2 L H₂O_{bidest.}, pH 8,3) befüllt. Die Geltaschen wurden dann mit jeweils 10 µl der Proteinproben beladen. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard, der definierte Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthält, (Amersham[™] Low-Range RPN755 / High-Range RPN756E Rainbow Marker, GE Healthcare, München) mitgeführt, um das Spektrum der aufgetrennten Proteinproben anhand des Molekulargewichts abschätzen zu können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in zwei Schritten: zunächst bei konstanten 180 V und 26 mA für 20 min. zur Sortierung der Proteine nach Molekulargewicht im Sammelgel. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte dann unter konstanten 180 V, 32 mA, für 40 - 45 min.

2.5.4. Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen

Die Übertragung der *Salmonella outer proteins* auf eine PVDF-Membran (BioRad, München) erfolgte mittels *semi-dry* Blot-Verfahren. Dafür wurden zunächst pro Blot zwei Filter (Whatman GB003, Dassel) in Anodenpuffer 1 (0,3 M Trishydroxymethylaminomethan [36,3 g], 20 %iges Methanol, ad 1 L), ein Filter in Anodenpuffer 2 (25 mM Trishydroxymethylaminomethan [3,0 g], 20 %iges Methanol, ad 1 L) und drei Filter in dem Kathodenpuffer (25 mM Trishydroxymethylaminomethan [3,0 g], 40 mM ε- Amino-capronsäure [5,2 g], 0,01 % SDS, 20 %iges Methanol ad 1 L) getränkt. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung der Membranoberfläche für ca. 1 min. in Methanol beidseitig benetzt, womit die Aufnahme der Proteine gewährleistet wird. Anschließend wurde die PVDF-Membran in Anodenpuffer 2 getränkt. Der Blot (Trans-Blot[®] SD-semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München) wurde wie folgt aufgebaut: zwei Lagen in Anoden-Puffer 1 getränktes Filter-Papier, eine Lage in Anoden-Puffer 1 getränktes Filter-Papier, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und schließlich drei Lagen in Kathoden-Puffer getränktes Filter-Papier. Die Proteine wurden bei 22 V und 150 mA für 15 min. aus dem SDS- Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

2.5.5. Nachweis der Proteine mittels Western-Blot

Nach Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst für 2 h bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung (5 % entfettetes Milchpulver/10 ml TBS [50 ml Tris- Konzentrat (Biorad, München) ad 500 ml H₂O_{bidest.}]) inkubiert, um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde dreimal für jeweils 4 min. mit 10 ml TBS-Tween20 (100 ml Tris-Konzentrat, 450 µl Tween ad 1 L H₂O_{bidest.}) gewaschen und die Effektorprotein-spezifische Lösung polyklonaler Antikörper zugegeben (10 µl AK-Verdünnung/10 ml TBS-Tween20) (Tab. 8).

Tabelle 8: Die für den Nachweis der Effektorproteine mittels Western Blot eingesetzten Antikörper*

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Goat Anti-Rabbit IgG. Alkalische Phosphatase- gekoppelt	1:2000	Southern Biotech, Birmingham, USA
Anti-Salmonella-AvrA IgG, aus Kaninchen	1:30 000	STRECKEL <i>et al.</i> 2004
Anti-Salmonella-SopB IgG, aus Kaninchen	1:30 000	WOLF 2004
Anti-Salmonella-SopD IgG, aus Kaninchen	1:10 000	STRECKEL <i>et al.</i> 2004
Anti-Salmonella-SopE1 / SopE2 IgG, aus Kaninchen	1:40 000	Prof. Hardt, ETH Zürich, Schweiz

*(Tabelle nach KOHLMANN 2008)

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Membran fünfmal für jeweils 4 min. mit TBS-Tween20 gewaschen und der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte 2. Antikörper (5 µl Goat-anti-Rabbit- AK [Biozol Diagnostika]/10 ml TBS + 0,6 % entfettetes Milchpulver) konnte zugegeben werden. Die Membran wurde dann für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend sechsmal für jeweils 4 min. in TBS-Tween20 gewaschen und dreimal kurz mit H₂O_{bidest.} abgespült. Zur Entwicklung der spezifischen Proteinbanden wurde eine BCIP/NBT-Substrat-tablette (SigmaFast™, München) in 10 ml H₂O_{bidest.} gelöst und auf die Membran gegeben. Die Umsetzung des Substrates durch die alkalische Phosphatase führt zu einer Färbung der spezifischen Proteinbanden. Nach der Färbereaktion wurde die Substratlösung dekantiert, die Membran mehrmals mit H₂O_{bidest.} gespült und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.6. Darstellung der Ergebnisse in einem Informationssystem

Die in dieser Arbeit gewonnenen Brunnen- und Analyse-Daten wurden in ein multimediales interaktives Präsentations- und Informationssystem eingebunden. In Form eines digitalen Atlas werden die Wasserstellen, in deren Wasser seit dem Jahr 2002 Kontaminationen durch enteritische Salmonellen nachgewiesen wurden, dargestellt. Gleichzeitig kann der Nutzer die Informationen der Brunnen und der untersuchten *Salmonella*-Stämme abfragen. Durch ein solches System können die Daten einem möglichst weiten Publikum zugänglich gemacht werden. Besonders Nutzer in Benin sollen mit Hilfe des Systems „*SalmEau* - Kontamination von Wasserstellen durch enteritische Salmonellen im oberen Ouémé Einzugsgebiet“ („*Contamination des sources d'eau par des Salmonelles entéritiques dans la HVO*“) auf die Problematik der Wasserqualität aufmerksam gemacht werden und Informationen über die Serotypen- und Sequenztypen-Verteilung von Umwelt-Salmonellen in ihrem Land erhalten. Das System wurde mit dem frei zugänglichen Computer-Programm Geopublisher von der Firma Wikisquare (<http://www.wikisquare.de/>) entwickelt (KRÜGER 2009).

3. Ergebnisse

3.1. Unzulängliche Trinkwasserversorgung und –hygiene im Untersuchungsgebiet

3.1.1. Offene Brunnen als häufigste Trinkwasserquelle

Der ländlichen Bevölkerung stehen in Benin verschiedene Arten der Wasserversorgung zur Verfügung. Am häufigsten finden sich traditionelle Brunnen, die von den Dorfbewohnern selbständig ausgehoben werden und mit einer Schachtwand aus Lehm und einer meist sehr niedrigen, häufig durch starke Niederschlagsereignisse zerfallenen Brunnenmauer aus Lehmziegeln versehen sind (Abb. 2 a) und Abb. 18 a), b.). Wie die Auswertung der Brunnendatenbank ergeben hat, sind traditionelle Brunnen in der Regel weniger tief (durchschnittlich ca. 5 m) als moderne Brunnen (durchschnittlich ca. 10 m), die meist aus gestapelten Betonringen aufgebaut sind und von der staatlichen Wasserbehörde DG-Eau oder von internationalen Brunnenbau-Projekten und NGOs installiert werden. Der Brunnenschacht, die Brunnenmauer und eine Brunnenfassung, die vor Einlaufen von Sickerwasser schützt, bestehen aus Beton und es gibt bei modernen Brunnen häufig eine Kurbel mit befestigtem Schöpfgerät sowie einen Metaldeckel (Abb. 2 b). Bohrlöcher, die mit Hand- oder Fußpumpen versehen sind (Abb. 2 d), stehen nur wenigen Bewohnern des ländlichen Benin als Trinkwasserquelle zur Verfügung. Sie ermöglichen die Förderung von Grundwasser aus bis zu 60 m Tiefe. In zwei Dörfern (Manigri und Wari Maro) sind so genannte *AEV (Adduction d'Eau Villageoise)* entstanden, für die Wasser aus einem Bohrloch in einen Wasserturm gepumpt wird, von dem aus mehrere Wasseranschlüsse in einem Dorf gespeist werden. Flüsse und so genannte *Marigots*, Tümpel oder kleine Seen (Abb. 2 c), die sich in der Regenzeit vielerorts bilden, werden ebenfalls von einigen Menschen als Trinkwasserquelle genutzt. Während der Beprobungsfahrten zeigte sich im Laufe der vergangenen Jahre, dass die Situation der Wasserversorgung sich in einigen Dörfern des oberen Ouémé Einzugsgebietes geändert hatte. In manchen Dörfern ist eine Vielzahl neuer traditioneller Brunnen gebaut worden (Beispiel: Kpawa), es sind einige neue Bohrlöcher realisiert worden

und ein großer Anteil der Brunnen, die in den Jahren 2000/2001 bei der Entstehung der Brunnendatenbank noch in Betrieb waren, ist in der Zwischenzeit ausgetrocknet oder versandet. Wie die Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, sind in den vergangenen acht Jahren etwa 600 neue Wasserstellen in der Region entstanden, allerdings hat sich bei gestiegener Gesamtzahl das Verhältnis von offenen Brunnen zu geschlossenen Pumpensystemen kaum geändert.

Tabelle 9: Die verschiedenen Arten der Trinkwasserversorgung im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet und deren prozentuale Verteilung in den Jahren 2001, 2005 und 2008

Art der Wasserquelle	Anzahl (%) 2001	Anzahl (%) 2005	Anzahl (%) 2008
Flüsse	5 (0,4 %)	5 (0,4 %)	5 (0,3 %)
Tümpel (<i>Marigots</i>)	60 (4,7 %)	60 (4,3 %)	60 (3,2 %)
Traditionelle Brunnen	980 (77,5 %)	1029 (74,5 %)	1461 (78,6 %)
Moderne Brunnen	154 (12,2 %)	201 (14,6 %)	219 (11,8 %)
Pumpen (Hand- und Fußpumpen)	65 (5,2 %)	85 (6,2 %)	111 (6,0 %)
AEV (<i>Adduction d'Eau Villageoise</i>)	1 (0,07 %)	1 (0,07 %)	2 (0,1 %)
Gesamt	1265	1381	1858

3.1.2. Unzureichender Zugang zu Pumpen in den Dörfern

Die Auswertung der Brunnendatenbank hat gezeigt, dass seit 2001 90 % aller im Untersuchungsgebiet zur Verfügung stehenden Wasserstellen traditionelle und moderne Brunnen sind, wohingegen Pumpen lediglich 5 % der gesamten Wasserquellen ausmachen (Tab. 9, Abb. 2 d). Mehr als 35 Dörfer verfügen nach wie vor über keine Pumpe zur Versorgung der Einwohner mit Trinkwasser. Die in 23 ausgewählten Dörfern durchgeführten Umfragen zur Situation der Trinkwasserversorgung ergaben, dass Einwohner von 86 % der befragten Dörfer ihren Zugang zu Trinkwasser aus Pumpenanlagen als nicht ausreichend ansehen. In 43 % gaben die befragten Vertreter der Dörfer an, dass in ihrem Dorf häufig Durchfallerkrankungen auftreten. In Dörfern, in denen selten Durchfall vorkam wurde das auf den Konsum von Wasser aus Pumpen anstatt offener Brunnen zurückgeführt.

3.1.3. Fehlende sanitäre Einrichtungen

Für 56 Dörfer wurde eine Latrinendatenbank erstellt, in der die Daten von insgesamt 226 Latrinen erfasst sind. In 19 Dörfern haben die Einwohner keinen Zugang zu Latrinen. In den verbleibenden Dörfern gibt es durchschnittlich 6 Latrinen, wobei es sich häufig um einfache, von den Dorfbewohnern gegrabene Gruben handelt (Abb. 9 b). Viele der von staatlicher Initiative oder von NGOs gebauten Anlagen befinden sich in einem baufälligen Zustand (Abb. 9 a). Für Wasser aus Pumpenanlagen blieb der Nachweis von Salmonellen und *E. coli* auch negativ, wenn der Abstand zu einer Latrine kleiner als 50 m war.

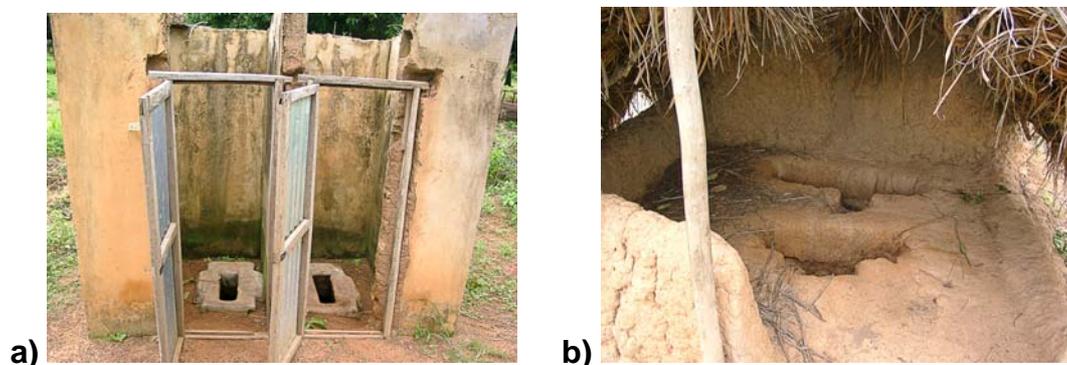


Abbildung 9: Beispiele für Latrinen, zu denen im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet nur wenige Menschen Zugang haben

3.1.4. Fäkale Verunreinigung des Trinkwassers

Der qualitative Nachweis des Fäkalindikatorkeims *E. coli* mittels Anreicherung in Laktose-Bouillon und Ausstrich auf selektivem Chromagar (*Chromogenic E. coli/coliform Agar*, Fa. Oxoid, Wesel) ergab, dass mehr als 70 % aller Wasserstellen im Beprobungsgebiet fäkal kontaminiert sind. Dazu gehören die traditionellen und modernen Brunnen, *Marigots* und Flüsse. Wasser aus Bohrlöchern (Pumpen und AEV) erwies sich als bakteriologisch unbedenklich – es konnten lediglich in zwei Fällen coliforme Bakterien nachgewiesen werden.

3.2. Isolierung von Salmonellen

3.2.1. Kontamination des Trinkwassers durch Salmonellen

Seit November 2002 sind 177 Stämme enteritischer Salmonellen aus 143 Wasserstellen isoliert worden (Tab. 10). Circa 8 % der untersuchten Wasserstellen waren durch enteritische Salmonellen kontaminiert. Bei der Untersuchung der im Zeitverlauf kontrollierten Brunnen in den Referenzdörfern Kpawa, Kaki Koka, Kpessou, Vanhoui und Tiranga wurden 35 Salmonellen-Stämme in ca. 450 Wasserproben nachgewiesen. Die meisten der im Untersuchungsgebiet isolierten Salmonellen stammen aus Wasserproben traditioneller Brunnen (n = 82), allerdings waren, wie aus Tabelle 10 zu sehen ist, auch 17 moderne Brunnen durch Salmonellen-Kontaminationen belastet (Beispiele WEW-3 und TIR-8, Abb. 10). Zehn Isolate stammen aus Tümpeln – den so genannten *Marigots* – und drei wurden aus Tonkrügen (*Jarre*), die zur Wasserlagerung in den Haushalten genutzt werden, isoliert (Abb. 6 a) (LAGNIKA 2008). Lediglich die Wasserproben, die von Hand- oder Fußpumpen oder AEV stammten, waren frei von Salmonellen. Isolate, die im Kligler-, Harnstoff- und LIM-Agar-Test die für Salmonellen typischen biochemischen Eigenschaften aufwiesen, durch den Analyseautomaten VITEK2 (Fa. BioMérieux) am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene primär allerdings nicht als Salmonellen bestätigt wurden, wurden dennoch zur Serotypisierung zum RKI nach Wernigerode geschickt. Es stellte sich heraus, dass es sich um Salmonellen handelte. Der Grund für die widersprüchlichen Befunde dürfte in den Bioassays aus Isolaten klinischer Proben zu suchen sein, die den maschinellen Analysen via VITEK2 zugrunde liegen.



Abbildung 10: Beispiele für zwei von insgesamt 17 modernen Brunnen, aus deren Wasser enteritische Salmonellen isoliert wurden.

a) Aus dem Brunnen mit der Abkürzung WEW-3 wurde am 06.06.2006 *S. Virchow* (Stamm 119 WEW-3) und am 07.12.2006 *S. Luke* (Stamm 122 WEW-3) isoliert. **b)** Der Brunnen TIR-8 wies am 15.12.2004 Kontaminationen durch *S. Typhimurium* (Stamm 89 TIR-8) und am 12.06.2006 durch *S. Amoutive* (Stamm 129 TIR-8) auf.

3.2.2. Isolierung von Salmonellen aus Stuhlproben

In dem Dorf Kaki Koka wurden zwei Studien mit dem Ziel durchgeführt, die Aquisition von Salmonellen durch Konsum kontaminierten Trinkwassers zu untersuchen. In der ersten Studie (2003/2004) konnten enteritische Salmonellen sechs verschiedener Serotypen (*S. Johannesburg*, *S. Amoutive*, *S. Elisabethville*, *S. Koketime*, *S. Teshie* und *S. Nima*) aus fünf Brunnen des Dorfes isoliert werden (Brunnen-Abkürzungen: KAK-9, KAK-SR, KAK-S, KAK-3, KAK-SS) (Tab. 34 und Tab. 35, Anhang 11.2.). In den untersuchten Stuhlproben wurden Salmonellen fünf verschiedener Serotypen (*S. Cubana*, *S. Waycross*, *S. Sanger*, *S. Typhi*, *S. Offa*) (Tab. 11) nachgewiesen, die in keinem Fall mit den aus Wasserproben nachgewiesenen Serotypen übereinstimmten (Tab. 34). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Studie im Zeitraum von April - Juni 2008 wiederholt. In dieser Zeit wurden erneut alle Wasserstellen des Dorfes sowie Stuhlproben von 201 Einwohnern untersucht. Durch die Weiterverarbeitung sämtlicher aus einer Stuhl- bzw. Wasserprobe isolierten Salmonellenkolonien konnten durch Subkultivierung von Einzelkolonien entstehende Isolationsfehler unterbunden werden. In 6,5 % der Fälle stimmte der *Salmonella*-Serotyp der kontaminierten Stuhlprobe mit dem Serotypen aus der vom Probanden genutzten Trinkwasserquelle überein (*S. Koketime*, *S. Apeyeme*, *S. Chandans*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*) (Tab. 11

und Tab. 20). Aus einigen Stuhl- und auch aus Wasserproben konnten zeitgleich mehrere unterschiedliche *Salmonella*-Serotypen isoliert werden (Stuhl z.B. st. 22: *S. Koketime* und *S. Elisabethville*; st. 23: *S. Elisabethville*, *S. Koketime* und *S. Teshie*; st. 97: *S. Chandans* und *S. Typhimurium*; Wasser z.B. KAK-11: *S. Typhimurium*, *S. Chandans*) (unveröffentlichte Daten; KRÖGER 2008, ZOBEL 2008). Insgesamt wurden während der beiden Studien in Kaki Koka 63 Stämme enteritischer Salmonellen und zwei *Salmonella* Typhi-Stämme aus 55 Stuhlproben von Einwohnern des Dorfes isoliert. 18 dieser Isolate wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels MLST weiter untersucht (Tab. 20, Tab. 35, Anhang 11.2.) und für sechs der Stämme wurde die Expression ausgewählter Pathogenitätsfaktoren bestimmt (Tab. 34).

3.2.3. Identifizierung selten vorkommender Serotypen

Die Ergebnisse der vom Robert Koch Institut in Wernigerode und vom Hygiene Institut in Hamburg durchgeführten Serotypisierungen zeigten, dass es sich bei den beninischen Isolaten aus Wasser- und Stuhlproben um eine Vielzahl verschiedener Serotypen handelt, von denen keiner vorherrschend im oberen Ouémé Einzugsgebiet vorkommt (Tab. 10 und Tab. 13). Die aus Wasser isolierten Salmonellen-Stämme konnten insgesamt 79 verschiedenen Serotypen zugeordnet werden. Die drei am häufigsten nachgewiesenen Serotypen sind *S. Give* mit 13 Isolaten (7,3 %), gefolgt von *S. Virchow* (11 Isolate, 6,2 %) und *S. Takoradi* (10 Isolate, 5,6 %). *S. Oakland* und *S. Rubislaw* wurden jeweils neunmal isoliert (5,1 %), *S. Luke* achtmal (4,5 %), *S. Nima* 5 mal (4,0 %), *S. Typhimurium*, *S. Elisabethville*, die monophasische Spp.I Variante < 47 : c : - > und *S. Muenster* wurden jeweils sechsmal isoliert (3,4 %), *S. Koketime* fünfmal (2,8 %), *S. Chester* viermal (2,3 %) und *S. Teshie*, *S. Amoutive*, *S. Bredeney*, *S. Kaneshie*, *S. Rostock* und die monophasische Spp.I Variante < 47 : z4, z23 : - > jeweils dreimal (1,7 %) (Tab. 13). 59 Serotypen wurden nur ein bis zwei Mal in Wasserproben entdeckt. Um Fehler auszuschließen, wurde die Serotypisierung für einige Salmonellen wiederholt. Wie in Tabelle 12 zu sehen ist, konnten die ursprünglichen Serotypisierungs-Ergebnisse häufig

bestätigt werden, in einigen Fällen ergab sich allerdings durch erneute Serotypisierung eine andere bzw. vollständigere Antigenformel. Ein bislang unbekannter Serotyp mit der Antigenformel < 1, 42 : l, w : z₃₅ > wurde zweimal im Abstand von ca. vier Monaten (15.04.2003 und 08.08.2003) aus einem Wasserloch in dem Dorf Yatanifaga isoliert (Abb. 12). Weitere Nachweisversuche blieben danach erfolglos, da das Wasserloch in der Trockenzeit 2003/2004 versandet ist. Nachdem die Antigenformel vom *Centre National de Référence des Salmonella* in Paris bestätigt wurde, ist der Stamm in der 9. Edition des White-Kauffmann-Le Minor Schemas (GRIMONT und WEILL 2007) als ***Salmonella Parakou*** enthalten (Abb. 11).

P

Pakistan	8	l,v	1,2
Palamaner	<u>1</u> ,44	d	z ₃₅
Palime	6,7	z ₃₅	e,n,z ₁₅
Panama	<u>1</u> ,9,12	l,v	1,5
Papuana	6,7	r	e,n,z ₁₅
Parakou	<u>1</u> ,42	l,w	z ₃₅
Paratyphi A	<u>1</u> ,2,12	a	[1,5]
Paratyphi B	<u>1</u> ,4,[5],12	b	1,2
Paratyphi C	6,7,[Vi]	c	1,5
Paris	8, <u>20</u>	z ₁₀	1,5

Abbildung 11: Eintrag des neu entdeckten Serotypen *Salmonella Parakou* in die 9. Edition des White-Kauffmann-Le Minor Schemas (GRIMONT und WEILL 2007)



Abbildung 12: Wasserloch in dem Dorf Yatanifaga, aus dem 2003 *Salmonella Parakou* isoliert werden konnte

Tabelle 10: Im Beprobungsgebiet Bassila-Parakou-Djougou seit 2002 aus Wasserproben isolierte *Salmonella*-Serotypen, die für die vorliegende Arbeit untersucht wurden; alphabetisch nach Dörfern sortiert. Abkürzungen: PT = traditioneller Brunnen (*Puits traditionnel*), PM = moderner Brunnen (*Puits moderne*), MA = Tümpel (*Marigot*), JA = Tonkrug zur Wasserlagerung im Haushalt (*Jarre*).

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	Datum Proben- nahme	Quelle	Dorf
79 BANI-1	Spp.I monophas.	28 : b : -	07.12.04	PM	Banigri
109 BET-7	Vanier	28 : z : 1,5	06.05.05	PT	Bétérou
99 BET-10	Cotham	28 : i : 1,5	06.05.05	PT	Bétérou
44 BET-20	Johannesburg	1,40 : b : e,n,x	21.11.03	PT	Bétérou
33 BG-11	Teshie	1,47 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	2002	PT	Bougou
40 BG-61	Give	3,10 : l,v : 1,7	13.07.04	PT	Bougou
69 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	06.05.03	MA	Dama
70 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	12.08.03	MA	Dama
56 DEN-M1	Hofit	1,9,12 : g,p,u : -	2002	MA	Dendougou
42 DEN-M3	Hofit	39 : i : 1,5	2002	MA	Dendougou
32 DEN-M4	Dahomey	47 : k : 1,6	2002	MA	Dendougou
57 DEN-2	Rostock	1,9,12 : g,p,u : -	2002	PM	Dendougou
58 DEN-5	Rostock	1,9,12 : g,p,u : -	2002	PM	Dendougou
54 DJE-5	Nima	28 : y : 1,5	05.07.03	PT	Djehou
12 DJE-5	Pomona	28 : y : 1,7	14.06.04	PT	Djehou
25 FAKA-1	Egusitoo	1,42 : b : z ₆	24.06.03	PM	Fakafaka
2 FOM-2	Benue	6,8 : y : l,w	19.03.04	PT	Fomerou
26 FOM-5	Infantis	6,7 : r : 1,5	19.03.04	PT	Fomerou
111 DOG	Takoradi	6,8 : i : 1,5	28.02.05	PT	Dogué
18 GREG	Cotham	28 : i : 1,5	28.10.03	PT	Gregoire
61 GREG	Nima	28 : y : 1,5	21.08.04	PT	Gregoire
41 GOU-11	Give	3,10 : l,v : 1,7	21.08.04	PT	Goumbakou I
147 GOU-14	Uzaramo	6,14,25 : z ₄ ,z ₂₄ : -	23.02.08	PT	Goumbakou I
144 M1SGui**	Blukwa	18 : z ₄ ,z ₂₄ : -	23.07.07	JA	Guinlerou
148 M1SGui**	Luke	47 : g,m : -	20.08.07	JA	Guinlerou
145 M4SGui**	Blukwa	18 : z ₄ ,z ₂₄ : -	23.07.07	JA	Guinlerou
80 IGER-3	Takoradi	6,8 : i : 1,5	02.12.04	PT	Igbere
29 KAK-M2	Saphra	16 : y : 1,5	30.08.04	MA	Kaki Koka
163 KAK-V***	Luke	47 : g,m : -	13.05.08	MA	Kaki Koka
11 KAK-S	Virchow	6,7 : r : 1,2	14.11.03	PT	Kaki Koka
45 KAK-S	Koketime	44 : z ₃₈ : -	23.02.04	PT	Kaki Koka
81 KAK-S	Koketime	44 : z ₃₈ : -	14.12.04	PT	Kaki Koka
82 KAK-S	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	25.01.05	PT	Kaki Koka

Stamm- Bezeichnung*	Salmonella Serotyp	Antigenformel	Datum Proben- nahme	Quelle	Dorf
112 KAK-S	Koketime	44 : z ₃₈ : -	20.09.05	PT	Kaki Koka
151 KAK-S***	Herston	6,8 : d : e,n,z ₁₅	24.04.08	PT	Kaki Koka
152 KAK-SS***	Chester	4,12 : e,h, : e,n,x	24.04.08	PM	Kaki Koka
5 KAK-SR	Amoutive	28 : d : 1,5	14.11.03	PM	Kaki Koka
120 KAK-SR	Nima	28 : y : 1,5	17.03.06	PM	Kaki Koka
75 KAK-3	Teshie	1,47 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	14.11.03	PT	Kaki Koka
83 KAK-3	Abaetetuba	11 : k : 1,5	19.10.04	PT	Kaki Koka
84 KAK-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	14.12.04	PT	Kaki Koka
85 KAK-3	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	25.01.05	PT	Kaki Koka
134 KAK-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	14.03.07	PT	Kaki Koka
153 KAK-3	Koketime	44 : z ₃₈ : -	24.04.08	PT	Kaki Koka
156 KAK-3***	Apeyeme	8,20 : z ₃₈ : -	06.05.08	PT	Kaki Koka
43 KAK-9	Johannesburg	1,40 : b : e,n,x	14.11.03	PT	Kaki Koka
86 KAK-11	Plymouth	9,46 : d : z ₆	25.01.05	PT	Kaki Koka
157 KAK-11***	Chandans	11 : d : e,n,x	05.05.08	PT	Kaki Koka
158 KAK-11***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	05.05.08	PT	Kaki Koka
166 KAK-11***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	19.05.08	PT	Kaki Koka
162 KAK-12***	Vanier	28 : z : 1,5	08.05.08	PT	Kaki Koka
154 KAK-18***	Virchow	6,7 : r : 1,2	30.04.08	PT	Kaki Koka
155 KAK-19***	Kaneshie	42 : i : l,w	24.04.08	PT	Kaki Koka
13 KOB-M	Bredeney	4,12:l,v : 1,7	25.05.04	MA	Kobrikonto
123 KOB-5	Amoutive	28 : d : 1,5	23.07.07	PT	Kobrikonto
124 KOB-8	Give	3,10 : l,v : 1,7	23.07.07	PT	Kobrikonto
8 KOB-11	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -	06.11.03	PT	Kobrikonto
125 KOB-17	Give	3,10 : l,v : 1,7	23.07.07	PT	Kobrikonto
72 KPG-1	Spp.I monophas.	6,8 : i : -	06.05.03	PT	Kperu-Guera
73 KPG-1	Spp.I monophas.	6,8 : i : -	12.08.03	PT	Kperu-Guera
127 KPES-1	Luke	47 : g,m : -	25.09.06	PM	Kpessou
128 KPES-3	Luke	47 : g,m : -	02.06.06	PT	Kpessou
59 KAW-M4	Rubislaw	11 : r : e,n,x	2002	MA	Kpawa
115 KAW-2	Anecho	35 : g,s,t, : -	27.09.06	PT	Kpawa
130 KAW-2	Spp.I rauh	-	27.09.06	PT	Kpawa
131 KAW-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	27.09.06	PT	Kpawa
132 KAW-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	14.03.07	PT	Kpawa
133 KAW-9	Oakland	6,7 : z : 1,6	27.09.06	PT	Kpawa
135 KAW-10	Oakland	6,7 : z : 1,6	27.09.06	PT	Kpawa
136 KAW-12	Rubislaw	11 : r : e,n,x	27.09.06	PT	Kpawa
137 KAW-18	Rubislaw	11 : r : e,n,x	27.09.06	PT	Kpawa

Stamm- Bezeichnung*	Salmonella Serotyp	Antigenformel	Datum Proben- nahme	Quelle	Dorf
139 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	26.07.06	PT	Kpawa
138 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	04.05.06	PT	Kpawa
140 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	04.09.06	PT	Kpawa
114 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	26.09.06	PT	Kpawa
141 KAW-20	Rubislaw	11 : r : e,n,x	07.12.06	PT	Kpawa
142 KAW-22	Oakland	6, 7 : z : 1,6	27.09.06	PT	Kpawa
143 KAW-23	Rubislaw	11 : r : e,n,x	07.12.06	PT	Kpawa
48 NGL-12	Minnesota	21 : b : e,n,x	28.07.04	PM	Nagaile
53 NGL-41	Neukoelln	6,7 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	30.08.04	PT	Nagaile
10 ONK-38	Virchow	6,7 : r : 1,2	09.02.04	PM	Onklou
19 ONK-46	Poona	13,22 : z : 1,6	20.01.04	PT	Onklou
64 PAPA-1	Pomona	28 : y : 1,7	21.06.03	PM	Paparapanga
150 PAPA-C	Durban	9,12 : a : e,n,z ₁₅	23.02.08	PT	Paparapanga
14 PAR-27	Chester	4,12 : e,h : e,n,x	23.02.04	PT	Partago
65 PAR-35	Spp.I monophas.	47 : c : -	12.03.03	PT	Partago
66 PAR-35	Spp.I monophas.	47 : c : -	12.08.03	PT	Partago
34 PAR-39	Give	3,10 : l,v : 1,7	12.03.03	PT	Partago
37 PAR-39	Give	3,10 : l,v : 1,7	12.08.03	PT	Partago
67 PAR-41	Spp.I monophas.	47 : c : -	18.02.04	PT	Partago
22 PAR-42	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	18.02.04	PT	Partago
4 PAR-79	Chandans	11 : d : e,n,x	28.02.04	PT	Partago
46 PAR-87	Luke	1,47 : g,m : -	28.02.04	PT	Partago
47 PAR-88	Luke	1,47 : g,m : -	28.02.04	PT	Partago
28 PAR-113	Landau	30 : i : 1,2	08.03.04	PT	Partago
9 PNS-29	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -	30.08.04	PT	Penesoulou
77 SAN-4	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2	11.11.03	PT	Sanson
52 SEB-M2	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	2002	MA	Sébou
97 SEB-2	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	10.04.05	PT	Sébou
87 SEB-4	Virchow	6,7 : r : 1,2	04.09.04	PT	Sébou
126 SEB-6	Oakland	6,7 : z : 1,6	27.07.07	PM	Sébou
1 SEB-14	Apapa	45 : m, t : -	2002	PM	Sébou
39 SUB-4	Give	3,10 : l, v : 1,7	14.04.04	PT	Suburuku
50 SUB-5	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	08.08.03	PT	Suburuku
49 SUB-5	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	28.04.03	PT	Suburuku
35 SUB-13	Give	3,10 : l,v : 1,7	16.06.03	PT	Suburuku
21 SUB-17	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	16.06.03	PT	Suburuku
55 SUB-22	Nima	28 : y : 1,5	27.04.04	PT	Suburuku
24 SUB-65	Give	3,10 : l,v : 1,7	14.04.04	PT	Suburuku

Stamm- Bezeichnung*	Salmonella Serotyp	Antigenformel	Datum Proben- nahme	Quelle	Dorf
78 SUB-72	Wil	6,7 : d : l, Z ₁₃ , Z ₂₈	27.04.04	PM	Suburuku
149 SUB-73	Kibi	16 : z ₄ , Z ₂₃ : -	23.02.08	PT	Suburuku
71 TCHA-2	Spp.I monophas.	1,4,12 : l, w : -	25.03.04	PT	Tchanga- kalgo
27 TCHA-3	Kodjovi	47 : c : 1,6	25.03.04	PT	Tchanga- kalgo
113 TEBO-M	Virchow	6,7 : r : 1,2	23.03.05	MA	Tebo
108 THI-2	Takoradi	6,8 : i : 1,5	28.02.05	PT	Thian
94 THI-39	Virchow	6,7 : r : 1,2	28.02.05	PT	Thian
38 THI-44	Give	3,10 : l, v : 1,7	07.10.03	PT	Thian
95 THI-45	Virchow	6,7 : r : 1,2	28.02.05	PT	Thian
121 THI-48	Spp.I rauh	-	23.07.07	PM	Thian
88 TIR-7	Kodjovi	47 : c : 1,6	25.01.05	PT	Tiranga
89 TIR-8	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	15.12.04	PM	Tiranga
129 TIR-8	Amoutive	28 : d : 1,5	12.06.06	PM	Tiranga
90 TIR-9	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	15.12.04	PT	Tiranga
100 TIR-9	Bamboye	9,46 : b : l, w	14.02.05	PT	Tiranga
116 TIR-9	Urbana	30 : b : e, n, x	28.02.06	PT	Tiranga
118 TIR-10	Give	3,10 : l, v : 1,7	27.09.06	PT	Tiranga
101 TOR-11	Essen	4,12 : g, m : -	09.03.05	PT	Torou
107 TOR-19	Durban	9,12 : a : e, n, Z ₁₅	08.04.05	PT	Torou
36 VAN-1	Give	3,10 : l, v : 1,7	08.08.03	PT	Vanhoui
104 VAN-8	Braenderup	6,7 : e, h : e, n, Z ₁₅	26.04.05	PT	Vanhoui
105 VAN-12	Muenster	3,10 : e, h : 1,5	14.02.05	PM	Vanhoui
106 VAN-15	Nima	28 : y : 1,5	26.04.05	PT	Vanhoui
62 VAN-16	Poano	1,6,14,25 : z : l, Z ₁₃ , Z ₂₈	28.03.03	PT	Vanhoui
63 VAN-16	Poano	1,6,14,25 : z : l, Z ₁₃ , Z ₂₈	08.08.03	PT	Vanhoui
91 VAN-16	Kingston	4,12 : g, s, t : -	15.12.04	PT	Vanhoui
102 VAN-22	Bredeney	4,12 : l, v : 1,7	22.03.05	PT	Vanhoui
103 VAN-22	Bredeney	4,12 : l, v : 1,7	26.03.05	PT	Vanhoui
110 VAN-23	Spp.I monophas.	47 : c : -	26.04.05	PT	Vanhoui
92 VAN-24	Takoradi	6,8 : i : 1,5	20.10.04	PT	Vanhoui
93 VAN-24	Takoradi	6,8 : i : 1,5	29.10.04	PT	Vanhoui
15 WAS-1	Chester	1,4,12 : e, h : e, n, x	21.06.03	PM	Wassa
119 WEW-3	Virchow	6,7 : r : 1,2	06.06.06	PM	Wewe
122 WEW-3	Luke	47 : g, m : -	07.12.06	PM	Wewe
146 YAT-5	Parakou	1,42 : l, w : Z ₃₅	15.04.03	PT	Yatanifaga
60 YAT-5	Parakou	1,42 : l, w : Z ₃₅	08.08.03	PT	Yatanifaga

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	Datum Proben- nahme	Quelle	Dorf
31 YAT-6	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	29.04.03	PT	Yatanifaga
3 YAT-6	<i>S. bongori</i>	V 66 : z ₄₁ : -	12.08.03	PT	Yatanifaga
68 YAT-7	Kodjovi	47 : c : 1,6	24.03.04	PT	Yatanifaga
117 YAT-14	Give	3,10 : l,v : 1,7	06.05.06	PT	Yatanifaga
17 YATA-3	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	28.03.04	PT	Yataniga
74 YEB-7	Takoradi	6,8 : i : 1,5	12.12.03	PT	Yebessi
98 YEB-55	Oakland	6,7 : z : 1,6	10.04.05	PT	Yebessi
96 YEB-56	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	10.04.05	PT	Yebessi

* Die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserstelle zusammen; **LAGNIKA (2008); ***KRÖGER (2008) und ZOBEL (2008)

Tabelle 11: Aus Stuhlproben der Dorfbewohner von Kaki Koka isolierte Salmonellen, die im Rahmen dieser Arbeit mit MLST untersucht wurden. Nov. 2003: Isolate aus der von M. JOST durchgeführten Studie; 2008: von ZOBEL (2008) und KRÖGER (2008) isolierte Serotypen.

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	Datum der Proben- nahme
6 st.64	Cubana	13,23 : z ₂₉ : -	Nov. 2003
7 st. 109	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -	Nov. 2003
20 st.116	Offa	41 : z ₃₈ : -	Nov. 2003
30 st.163	Sangera	16 : b : e,n,z ₁₅	Nov. 2003
23 st.193	Sangera	16 : b : e,n, z ₁₅	Nov. 2003
76 st.198	Typhi	9,12,Vi : d : -	Nov. 2003
16 st.368	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	Nov. 2003
174 st.16	Virchow	6,7 : r : 1,2	2008
172 st.4	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	2008
173 st.9	Chester	4,12 : e,h : e,n,x	2008
175 st.22 s1.1	Koketime	44 : z ₃₈ : -	2008
178 st.23 s2.1	Koketime	44 : z ₃₈ : -	2008
176 st.22 s2.1	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	2008
182 st.42	Apeyeme	8,20 : z ₃₈ : -	2008
197 st.67	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	2008
200 st.97 s1.1	Chandans	11 : d : e,n,x	2008
209 st.136	Typhi	9,12, Vi : d : -	2008
205 st.119	Spp.I	30 : b : z ₆	2008

* Die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Nummer der Stuhlprobe zusammen

Tabelle 12: Ergebnisse wiederholter Serotypisierungen für einige ausgewählte Stämme. Abweichende Ergebnisse sind farbig markiert.

Stamm Bezeichnung*	Ergebnis erste Serotypisierung	Antigenformel	Ergebnis zweite Serotypisierung	Antigenformel
6 st.64	Cubana	13, 23 : z ₂₉ : -	Cubana	13, 23 : z ₂₉ : -
120 KAK-SS	Nima	28 : y : 1,5	Nima	28 : y : 1,5
55 SUB-22	Nima	28 : y : 1,5	Nima	28 : y : 1,5
42 DEN-M3	Hofit	39 : i : 1,5	Hofit	39 : i : 1,5
56 DEN-M1	Rostock	<u>1,9,12</u> : g,p,u : -	Hofit	39 : i : 1,5
59 KAW-M4	Rubislaw	11 : r : e,n,x	Rubislaw	11 : r : e,n,x
23 st.193	Hvittingfoss	16 : b : e,n,x	Sangera	16 : b : e,n,z ₁₅
136 KAW-12	Rubislaw	11 : r : e,n,x	Rubislaw	11 : r : e,n,x
7 st.109	Waycross	41 : z ₄ , z ₂₃ : -	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -
9 PNS-29	Waycross	41 : z ₄ , z ₂₃ : -	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -
116TIR-9	Urbana	30 : b : e,n,x	Urbana	30 : b : e,n,x
43 KAK-9	Johannesburg	1,40 : b : e,n,x	Johannesburg	1, 40 : b : e,n,x
62 VAN-16	Poano	1,6, 14,25 : z : l, z ₁₃ , z ₂₈	Poano	1,6,14,25 : z : l,z ₁₃ ,z ₂₈
12 DJE-5	Virchow	6,7 : r : 1,2	Pomona	28 : y : 1,7
68 YAT-7	Spp.I monophas.	47 : c : -	Kodjovi	47 : c : 1,6
88 TIR-7	Spp.I monophas.	47 : c : -	Kodjovi	47 : c : 1,6
69 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -
70 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -
19 ONK-46	Poona	13, 22 : z : 1, 6	Poona	13, 22 : z : 1, 6
26 FOM-5	Infantis	6, 7 : r : 1, 5	Infantis	6, 7 : r : 1, 5
80 IGER-3	Takoradi	6, 8 : i : 1, 5	Takoradi	6, 8 : i : 1, 5
86 KAK-11	Plymouth	9, 46 : d : z ₆	Plymouth	9, 46 : d : z ₆
77, SAN-4	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2
90 TIR-9	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2
121 THI-48	Spp. I, raue Form	-	Spp. I, raue Form	-
130 KAW-2	Spp. I, raue Form	-	Spp. I, raue Form	-

* Die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserstelle bzw. Stuhlprobe zusammen

Tabelle 13: Serotypen, die häufiger als zweimal aus Wasserquellen des oberen Ouémé Einzugsgebietes isoliert werden konnten. 59 weitere Serotypen wurden jeweils ein oder zwei Mal isoliert. Insgesamt wurden 177 Stämme serotypisiert.

Serotyp <i>Salmonella</i>	Anzahl der Isolate	Prozentualer Anteil (%)
Give	13	7,3
Virchow	11	6,2
Takoradi	10	5,6
Oakland	9	5,1
Rubislaw	9	5,1
Luke	8	4,5
Nima	7	4,0
Typhimurium	6	3,4
Elisabethville	6	3,4
Muenster	6	3,4
Koketime	5	2,8
Chester	4	2,3
Teshie	3	1,7
Kodjovi	3	1,7
Spp.I < 47 : c : - >	3	1,7
Amoutive	3	1,7
Bredeney	3	1,7
Kaneshie	3	1,7
Rostock	3	1,7
Spp.I < 47 : z ₄ , z ₂₃ : - >	3	1,7

3.2.4. Überlebensdauer von Salmonellen in Wasserstellen

Durch die monatlich durchgeführten Wasseranalysen in ausgewählten Referenz-Dörfern zeigte sich die ausgeprägte Tenazität der Salmonellen. Isolate des gleichen Sero- und Sequenztypen (*S. Koketime*, ST519) konnten über einen Zeitraum von bis zu 82 Wochen in einer Wasserstelle nachgewiesen werden. In Tabelle 14 sind die Serotypen und ST aufgelistet, die mehr als einmal aus derselben Wasserquelle isoliert wurden. Ein Unterschied der Salmonellen-Belastung offener Wasserstellen im jahreszeitlichen Verlauf konnte nicht festgestellt werden, was darauf zurückzuführen ist, dass der Nachweis stets rein qualitativ mit einem Anreicherungsschritt erfolgte.

Tabelle 14: Isolierung von Stämmen des gleichen Sero- und Sequenztypen aus einer Wasserstelle mit zeitlichem Abstand. Abkürzungen: PT = traditioneller Brunnen (*Puits traditionnel*), PM = moderner Brunnen (*Puits moderne*)

Stamm- Bezeichnung*	Wasser- -quelle	Serotyp <i>Salmonella</i>	ST (MLST)	Beprobungs- daten	Zeitlicher Abstand
45 KAK-S				23.02.2004	
81 KAK-S	PT	Koketime	519	14.12.2004	82 Wochen
112 KAK-S				20.09.2005	
131 KAW-3	PT	Oakland	605	27.09.2006	24 Wochen
132 KAW-3				14.03.2007	
65 PAR-35	PT	Spp.I monophas. < 47 : c : - >	556	12.03.2003	22 Wochen
66 PAR-35				12.08.2003	
34 PAR-39	PT	Give	524	12.03.2003	22 Wochen
37 PAR-39				12.08.2003	
138 KAW-19				04.05.2006	
139 KAW-19	PT	Rubislaw	562	26.07.2006	20 Wochen
114 KAW-19				26.09.2006	
62 VAN-16	PT	Poano	550	28.03.2003	19 Wochen
63 VAN-16				08.08.2003	
146 YAT-5	PT	Parakou	549	15.04.2003	16,5 Wochen
60 YAT-5				08.08.2003	
49 SUB-5	PT	Muenster	321	28.04.2003	14,5 Wochen
50 SUB-5				08.08.2003	
72 KPG-1	PT	Spp.I monophas. < 6,8 : i : - >	531	06.05.2003	14 Wochen
73 KPG-1				12.08.2003	
158 KAK-11	PT	Typhimurium	19	05.05.2008	2 Wochen
166 KAK-11				19.05.2008	
92 VAN-24	PT	Takoradi	531	20.10.2004	1 Woche
93 VAN-24				29.10.2004	

* Die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserstelle zusammen

3.2.5. Antibiotika-Resistenzen

Für alle untersuchten Stämme wurden mit Hilfe der VITEK2-Testkarten für die Empfindlichkeitsprüfung (AST-N062, Fa. BioMérieux) in dem Analyseapparat VITEK2 die minimale Hemmstoffkonzentrationen (MHK) verschiedener Antibiotika bestimmt. 98 % aller untersuchten Stämme waren gegenüber den in Tabelle 15 aufgelisteten Antibiotika sensibel. Die Ergebnisse zeigten hoch sensible Keime, wie sie – anders als bei klinischen

Isolaten – für Umweltisolate zu erwarten waren. Die Resistenzmuster I, II und III (Tab. 15) konnten für jeweils einen einzelnen Stamm ermittelt werden:

Resistenzmuster I	Stamm 81 KAK-S, S. Kokoetime
Resistenzmuster II	Stamm 121 THI-48, raue Form
Resistenzmuster III	Stamm 76 st.198, S. Typhi

Tabelle 15: Empfindlichkeitsbestimmung der beninischen Isolate gegenüber verschiedener Antibiotika. S = sensibel, R = resistent

Getestete Antibiotika	Resistenzmuster und die ermittelten MHK		
	I	II	III
Ampicillin	≤ 2 S	≤ 2 S	≥ 32 R
Ampicillin/Sulbactam	≤ 2 S	≤ 2 S	8 I
Cefazolin	≤ 4 S	≤ 4 S	≤ 4 S
Cefotaxime	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
Cefpodoxime	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S
Ceftazidime	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
Cefuroxime	8 I	32 R	4 S
Cefuroxime Axetil	8 R	32 R	4 I
Ciprofloxacin	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S
Gentamicin	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
Imipenem	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
Levofloxacin	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S
Meropenem	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S	≤ 0,25 S
Nitrofurantion	≤ 16 S	≤ 16 S	128 I
Piperacillin	≤ 4 S	≤ 4 S	≥ 128 R
Piperacillin/Tazobactam	≤ 4 S	≤ 4 S	≤ 4 S
Tetracycline	≤ 1 S	≤ 1 S	≥ 16 R
Tobramycin	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≤ 20 S	≤ 20 S	≥ 320 R

3.3. MLST-Analyse

3.3.1. Amplifikation von *housekeeping* Gen-Abschnitten

Für insgesamt 165 *Salmonella* Stämme, von denen 19 aus Stuhl- und 146 aus Wasserproben stammten, wurden 500 – 900 bp große Abschnitte von sieben *housekeeping* Genen in Vorwärts- und Rückwärts-Richtung

amplifiziert. Abbildung 13 zeigt die für die Gen-Abschnitte spezifischen, gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte.

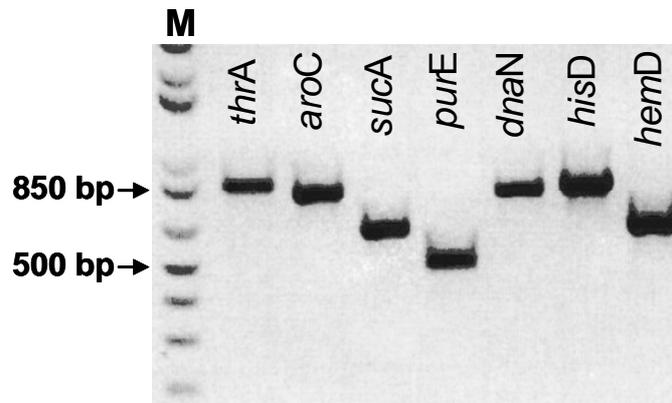


Abbildung 13: Agarosegel mit den aufgetrennten PCR-Produkten der untersuchten *housekeeping* Gene *thrA* (852 bp), *aroC* (826 bp), *sucA* (643 bp), *purE* (510 bp), *dnaN* (833 bp), *hisD* (894 bp), *hemD* (666 bp), M = 1Kb Plus DNA-Ladder (Fa. Invitrogen)

3.3.2. Unbekannte Allele und Sequenztypen (ST)

Ein Abgleich der MLST-Sequenzen mit der von Prof. Achtman entwickelten Datenbank auf der Website <<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>> ergab, dass viele der untersuchten Allele und die sich daraus ergebenden Sequenztypen bislang unbekannt waren. Die Anzahl der ermittelten Allele ist für die einzelnen Gen-Abschnitte in Tabelle 16 angegeben. Die Sequenzen der Allele, die im Rahmen dieser Arbeit in die *S. enterica*-MLST Datenbank eingefügt wurden, befinden sich im Anhang (11.3.). Die 165 mittels MLST untersuchten *Salmonella*-Isolate, die zu 54 verschiedenen Serotypen gehören, konnten insgesamt 68 verschiedenen Sequenztypen zugeordnet werden, von denen lediglich 9 bereits bekannt waren. Die Datenbank wurde somit um insgesamt 59 neue Sequenztypen (9,4 % aller in der Datenbank verzeichneten STs) erweitert (s. Beispiel, Abb. 14). Am häufigsten konnte ST303 (zehn Stämme, *S. Virchow*), gefolgt von ST516 (neun Stämme, *S. Give*) und ST605 (acht Stämme, *S. Oakland*) identifiziert werden (Tab. 16). Isolate der elf Serotypen *S. Chester*, *S. Give*, *S. Virchow*, *S. Nima*, *S. Waycross*, *S. Amoutive*, *S. Vanier*, *S. Takoradi*, *S. Typhimurium*, *S. Rubislaw* und *S. Pomona* ließen sich mehr als einem Sequenztypen zuordnen (Tab. 18). Gleichzeitig gibt es STs, deren Allelkombination bei Isolaten verschiedener Serotypen vorkommt (Tab.

19): ST531 (S. Takoradi und die monophasische Variante < 6, 8 : i : - >, ST553 (S. Hofit und S. Rubislaw), ST604 (S. Kodjovi und die monophasische Variante < 47 : c : - >), ST556 (S. Kodjovi und die monophasische Variante < 47 : c : - >) und ST520 (S. Nima und S. Pomona). Nach Betrachtung der Antigenformeln kann vermutet werden, dass es sich bei der monophasischen Variante < 6, 8 : i : - > um S. Takoradi (< 6, 8 : i : 1, 5 >), bzw. bei den beiden monophasischen < 47 : c : - > Varianten um S. Kodjovi (< 47 : c : 1, 6 >) handelt. Die beiden ST520- Stämme weisen sehr ähnliche Antigenformeln auf, die sich lediglich in der zweiten H-Phase unterscheiden: S. Nima < 28 : y : 1,5 > und S. Pomona < 28 : y : 1,7 >. Die Antigenformeln von S. Hofit (< 39 : i : 1, 5 >) und S. Rubislaw (< 11 : r : e, n, x >) zeigen allerdings keine Übereinstimmungen (Tab. 19).

Tabelle 16: Die für 165 untersuchte Stämme ermittelten Allele der sieben *housekeeping* Gen-Abschnitte

Gen	Anzahl ermittelte Allele	davon unbekannt
<i>aroC</i>	45	20
<i>dnaN</i>	44	25
<i>hemD</i>	29	8
<i>hisD</i>	53	33
<i>purE</i>	38	16
<i>sucA</i>	39	17
<i>thrA</i>	38	17

MLST Databases at the ERI, University College Cork

Back | UCC MLST Home | Allele / ST Query | Strain Query | Downloads | Analyses | Info | Login

Show column selector

[<-first] [previous] [20] [next] [last->] Showing records 2513 to 2532 of 2532 go to 2513 [Refresh]

Strain	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	ST	Serotype	Antigenic Formulas	Host	ET	Country	Continent	Year	Source
109 BET-7	169	84	8	189	8	169	156	612	Vanier	28 : z : 1, 5	Water	Unknown	Benin	Africa	2005	Alexandra Uesbeck
156 KAK-3	170	180	79	107	8	172	177	613	Apeyeme	8, 20 : z38 : -	Water	Unknown	Benin	Africa	2008	Alexandra Uesbeck
182 st.42	170	180	79	107	8	172	177	613	Apeyeme	8, 20 : z38 : -	Human stool	Unknown	Benin	Africa	2008	Alexandra Uesbeck
S05305-06	10	7	21	14	185	12	12	614	Newport		Bovine	Unknown	UK	Europe	2006	unknown
162 KAK-12	169	84	8	189	8	169	176	615	Vanier	28 : z : 1, 5	Water	Unknown	Benin	Africa	2008	Alexandra Uesbeck
SB3789	5	2	130	7	6	6	11	616	Enteritidis	9,12,g,m-	Human	Unknown	France	Europe	2002	S. Brisse
18 GREG	13	181	49	13	183	71	4	617	Cotham	28 : i : 1, 5	Water	Unknown	Benin	Africa	2003	Alexandra Uesbeck

Fertig

Abbildung 14: Eintrag der Allel-Nummern und der Stamm-Informationen in die *S. enterica*-MLST Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>)

Tabelle 17: Ermittelte Kombination von Allen und den sich daraus ergebenden Sequenztypen der untersuchten Salmonellen. Bislang unbekannte STs sind blau und neue Allele rot markiert.

ST	Allele							Serotypen <i>Salmonella</i>	Anzahl Isolate
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>		
2	1	1	2	1	1	1	5	Typhi	2
10	5	2	3	6	5	5	10	Rostock	2
19	10	7	12	9	5	9	2	Typhimurium	4
22	12	2	15	14	11	14	16	Braenderup	1
303	6	7	10	10	39	10	14	Virchow	10
306	111	47	49	16	41	15	4	Bredeney	3
321	119	10	17	42	12	13	4	Muenster	6
411	11	10	25	42	40	13	4	Chester	6
465	83	63	49	154	33	58	137	Chandans	3
512	13	109	49	13	12	13	4	Urbana	
513	18	7	128	9	39	9	153	Typhimurium	4
514	111	109	17	16	41	13	23	Pomona	1
515	13	109	49	157	12	13	4	Johannesburg	2
516	84	11	16	42	40	71	4	Give	9
517	148	37	126	183	114	45	126	Luke	7
518	101	41	40	184	76	90	3	Elisabethville	5

519	176	154	127	185	156	164	154	Koketime	6
520	111	109	17	149	41	58	23	Nima Pomona	4 1
521	52	63	48	186	36	165	3	Nima	2
524	84	150	16	42	40	166	4	Give	4
525	149	151	3	128	84	53	153	Cubana	1
526	150	152	36	103	132	167	4	Waycross	1
527	178	153	49	187	157	168	126	Sangera	2
528	19	111	8	188	95	6	155	Offa	1
529	169	84	8	189	158	169	156	Amoutive	1
530	165	157	44	190	159	170	22	Teshie	3
531	179	160	10	122	61	8	157	Takoradi Spp.I monophas	4 2
548	13	11	25	197	12	71	4	Minnesota	1
549	70	112	8	198	164	6	48	Parakou	2
550	175	11	125	199	9	174	160	Poano	2
551	177	165	8	196	39	9	153	Apapa	1
552	167	155	79	200	90	9	161	Saphra	1
553	171	156	15	7	5	132	2	Hofit Rubislaw	2 1
554	110	159	78	183	136	9	126	Waycross	1
555	172	166	10	122	61	90	86	Takoradi	1
556	170	20	3	201	165	9	33	Kodjovi Spp.I monophas	2 3
560	174	7	35	203	168	8	162	Spp.I monophas	2
562	37	4	46	205	8	175	164	Rubislaw	6
563	173	168	25	206	40	176	165	Wil	1
564	11	169	38	149	40	35	23	Abaetetuba	1
565	101	64	3	163	76	19	101	Plymouth	1
566	2	20	10	207	169	9	139	Bamboye	1
567	111	170	8	208	8	9	157	Essen	1
571	168	4	15	210	170	177	166	Landau	1
572	22	11	16	21	171	23	4	Durban	1
602	179	160	10	217	61	8	157	Takoradi	1
603	14	178	3	12	182	171	143	Infantis	1
604	170	20	3	218	165	9	33	Kodjovi Spp.I monophas	1 1
605	41	179	131	219	66	9	18	Oakland	8
606	103	2	10	220	184	185	102	Kaneshi	1
607	13	177	16	104	40	23	3	Dahomey	1
608	22	104	48	113	114	13	23	Poona	1
609	70	36	130	221	8	6	155	Neukoelln	1

610	84	37	129	222	8	9	175	Spp.I monophas	1
611	61	158	25	183	136	9	126	Waycross	1
612	169	84	8	189	8	169	156	Vanier	1
613	170	180	79	107	8	172	177	Apeyeme	2
615	169	84	8	189	8	169	176	Vanier	1
617	13	181	49	13	183	71	4	Cotham	2
618	178	182	10	10	39	10	14	Virchow	1
619	5	172	8	224	186	186	22	Anecho	1
620	193	183	43	220	187	9	156	Blukwa	2
621	39	184	108	223	188	187	85	Herston	2
622	150	75	140	225	132	157	178	Egusitoo	1
623	179	172	79	226	3	188	179	Spp.I monophas	1
625	194	4	79	227	169	189	180	Virchow	1
626	11	10	25	42	8	13	4	Chester	1
627	195	172	79	228	2	79	16	unbekannt	1
628	169	84	8	189	158	190	156	Amoutive	1

Tabelle 18: Serotypen, die sich in mehrere STs unterteilen. Unterschiedliche Allele sind farbig gekennzeichnet.

Serotyp <i>Salmonella</i>	ST	Allele							Anzahl Isolate
		<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	
Chester	411	11	10	25	42	40	13	4	6
	626	11	10	25	42	8	13	4	1
Give	524	84	150	16	42	40	166	4	4
	516	84	11	16	42	40	71	4	9
Virchow	625	194	4	79	227	169	189	180	1
	618	178	182	10	10	39	10	14	1
	303	6	7	10	10	39	10	14	10
Nima	520	111	109	17	149	41	58	23	4
	521	52	63	48	186	36	165	3	2
Waycross	611	61	158	25	183	136	9	126	1
	554	110	159	78	183	136	9	126	1
	526	150	152	36	103	132	167	4	1
Amoutive	628	169	84	8	189	158	190	156	1
	529	169	84	8	189	158	169	156	1
Vanier	612	169	84	8	189	8	169	156	1
	615	169	84	8	189	8	169	176	1
Takoradi	602	179	160	10	217	61	8	157	1
	531	179	160	10	122	61	8	157	4
	555	172	166	10	122	61	90	86	1

Serotyp <i>Salmonella</i>	ST	Allele							Anzahl Isolate
		<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	
Typhimurium	19	10	7	12	9	5	9	2	4
	513	18	7	128	9	39	9	153	4
Rubislaw	553	171	156	15	7	5	132	2	1
	562	37	4	46	205	8	175	164	6
Pomona	520	111	109	17	149	41	58	23	1
	514	111	109	17	16	41	13	23	1

Tabelle 19: Sequenztypen, zu denen verschiedene Serotypen gehören.

ST	Serotyp <i>Salmonella</i>	Antigenformel
531	Takoradi	6,8 : i : 1,5
	monophas. Var.	6,8 : i : -
553	Hofit	39 : i : 1,5
	Rubislaw	11 : r : e,n,x
604	Kodjovi	47 : c : 1,6
	monophas. Var	47 : c : -
556	Kodjovi	47 : c : 1,6
	monophas. Var	47 : c : -
520	Nima	28 : y : 1,5
	Pomona	28 : y : 1,7

3.3.3. Übereinstimmende Sequenztypen aus Wasser- und Stuhlproben

Für eine Auswahl der *Salmonella*-Stämme, die im Rahmen der Studie zur Akquisition von Salmonellen durch Konsum kontaminierten Trinkwassers isolierten wurden (s. 2.3.3.) (KRÖGER 2008, ZOBEL 2008), sind die Sequenztypen mittels MLST bestimmt worden. Dadurch sollte verifiziert werden, dass die Infektionen einiger Dorfbewohner tatsächlich auf die aus Wasser isolierten *Salmonella*-Stämme zurückzuführen waren. Für sechs untersuchte Fälle (Stuhlproben: st. 16, st. 22, st. 23, st. 42, st. 67, st. 97) konnte nachgewiesen werden, dass die Sequenztypen aus Stuhlproben mit denen übereinstimmten, die aus der vom Probanden genutzten Wasserquelle isoliert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Vergleich von *Salmonella* Sequenztypen, die in dem Dorf Kaki Koka aus Stuhlproben und den korrespondierenden (vom Probanden genutzten) Wasserquellen isoliert wurden (ZOBEL 2008, KRÖGER 2008). Stämme aus Wasserproben sind blau und Stämme aus Stuhlproben rot markiert.

Stamm-Bezeichnung*	Quelle	Serotyp <i>Salmonella</i>	ST	Datum (2008)	Genutzte Wasserquelle
153 KAK-3	Wasser	Koketime	519	24.04.	
175 st.22 s1.1	Stuhl	Koketime	519	30.04.	KAK-3
178 st.23 s2.1	Stuhl	Koketime	519	30.04.	KAK-3
156 KAK-3	Wasser	Apeyeme	613	06.05.	
182 st.42	Stuhl	Apeyeme	613	06.05.	KAK-3
157 KAK-11 s1.1	Wasser	Chandans	465	05.05.	
200 st.97 s1.1	Stuhl	Chandans	465	13.05.	KAK-11
166 KAK-11	Wasser	Typhimurium	19	05.05.	
197 st.67	Stuhl	Typhimurium	19	09.05.	KAK-11
154 KAK-18	Wasser	Virchow	303	30.04.	
174 st.16	Stuhl	Virchow	303	30.04.	KAK-18

* die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserquelle bzw. der Nummer der Stuhlprobe zusammen

3.3.4. Populationsstruktur beninischer *Salmonella*-Isolate

Abbildung 15 zeigt ein Populationsmodell für die in dieser Arbeit per MLST analysierten *Salmonella*-Isolate in Form eines *Minimum Spanning Trees*, der auf Grundlage der Allel-Profile der Isolate mit dem Programm BioNumerics 5.1 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien) in der Arbeitsgruppe von Prof. Achtman am UCC in Cork erstellt worden ist. Eine deutliche Aufteilung der STs in Gruppen ist nicht erkennbar, aber nach einem Abgleich der für diese Arbeit untersuchten Salmonellen mit der gesamten *S. enterica* MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) konnte ermittelt werden, dass die in Abbildung 15 farbig umkreisten STs jeweils einer evolutionären Gruppe zuzuordnen sind, die sich aus SLVs und DLVs zusammensetzt. Neben den sechs umkreisten Gruppen konnten viele der beninischen Isolate weiteren Gruppen zugeordnet werden, zu denen auch Stämmen anderer Studien gehören. Diese evolutionären Gruppen werden als *eBurstGroups* bezeichnet und folgendermaßen definiert: wenigstens zwei STs, von denen sechs der sieben Allele übereinstimmen (SLVs) oder ein ST, zu dem wenigstens zehn Isolate gehören (NAIR *et al.* 2009, unveröffentlichte Daten). Einzelne ST, zu denen wenigstens zwei Isolate gehören, werden

vorläufig als „provisorische Gruppen“ bezeichnet (persönliche Mitteilung von Prof. M. Achtman). Insgesamt konnte durch den Abgleich mit den MLST-Daten aller sich in der Datenbank befindenden Stämme (n ~ 2600) (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>) festgestellt werden, dass die beninischen Isolate zu 17 verschiedenen evolutionären Gruppen und zu weiteren 14 provisorischen Gruppen gehören. Die Zuordnung der untersuchten Stämme zu *eBurstGroups* oder provisorischen Gruppen ist in Tabelle 35 (Anhang 11.2.) aufgelistet.

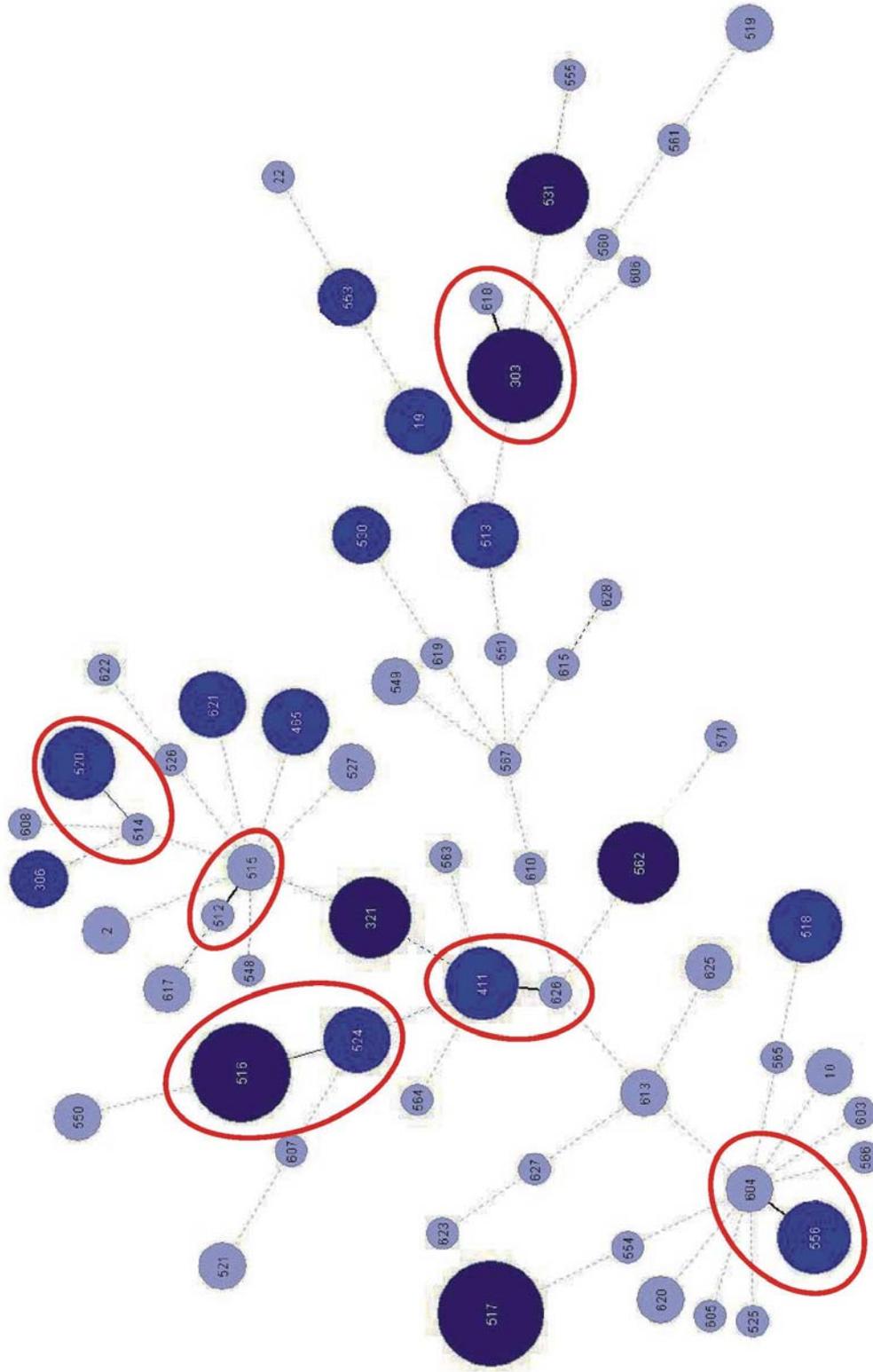


Abbildung 15: Populationsmodell von 165 beninischen *Salmonella*-Stämmen im *Minimum Spanning Tree* basierend auf den Allel-Profilen, die mittels MLST ermittelt wurden. Jeder Kreis repräsentiert einen ST, dessen Nummer in der Kreismitte zu finden ist. Die Größe und Farbe der Kreise entspricht der Anzahl an Stämmen, die den gleichen ST aufweisen: hellblaue Kreise repräsentieren 1 bis 2 Stämme, blaue Kreise enthalten 3 bis 5 Stämme und dunkelblaue 6 bis 10 Stämme. Die Linien zwischen den einzelnen STs zeigen den Abstand eines ST zu benachbarten STs an: fett gedruckte Verbindungslinie verdeutlichen, dass es sich um SLVs bzw. bei einfachen durchgezogenen Linien um DLVs handelt. Gestrichelte Linien stehen für TLVs, helle gestrichelte Linien deuten auf vier unterschiedliche Allele der benachbarten STs hin. Farblich umkreiste STs können jeweils einer evolutionären Gruppe zugeordnet werden.

In den Tabellen 21 – 32 werden 12 der ermittelten eBurstGroups dargestellt, die sich im *Minimum Spanning Tree* der gesamten *S.enterica*-MLST Datenbank befinden. Die Tabellen enthalten Informationen weiterer Stämme der jeweiligen Gruppen bzw. einiger repräsentativer Stämme, die im Rahmen anderer Studien beschrieben wurden (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>). Jeder Kreis repräsentiert einen ST, dessen Nummer in der Kreismitte angegeben ist. Die Gruppen sind dadurch gekennzeichnet, dass die dazugehörigen STs farbig, bzw. grau miteinander verbunden sind. Die fett gedruckten Verbindungslinien verdeutlichen, dass es sich um SLV, bzw. bei einfachen durchgezogenen Linien um DLV handelt. Die Größe und Farbe der Kreise gibt Auskunft über die Anzahl von Stämmen mit dem gleichen ST im Datensatz: blaue Kreise enthalten 3 bis 5 Stämme, dunkelblaue 6 bis 10 und rote 10 bis 20 Stämme.

Tabelle 21: eBurstGroup 9

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme		Referenz
	ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle(Land)	
303 (Virchow)	16 (Virchow)	Geflügel (Dänemark)	DVI
618 (Virchow)	38 (Virchow)	Mensch (Dänemark)	SSI
	181 (Virchow)	Eidechse (Deutschland)	R. HELMUTH
	326 (Virchow)	Mensch (unbekannt)	M. ACHTMAN
	359 (Virchow)	Mensch (UK)	HEALTH PROTECTION AGENCY

Tabelle 22: eBurstGroup 13

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle(Land)	Referenz
2 (Typhi)	1 (Typhi)	Human (Chile)	G. DOUGAN
	3 (Typhi)	Human (Senegal)	M. TORPDHAL
	8 (Typhi)	Human (Zaire)	G. DOUGAN

Tabelle 23: eBurstGroup 16

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
520 (Nima, Pomona)	536 (Gatow)	Mensch (Äthiopien)	J. WAIN
514 (Pomona)	451 (Pomona)	unbekannt (USA)	L. HARRISON

Tabelle 24: eBurstGroup 24

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
22 (Braenderup)	22 (Braenderup)	Mensch (Schottland)	J. WAIN
	194 (Braenderup)	Schlange (Deutschland)	R. HELMUTH
	311 (Braenderup)	Mensch (Schottland)	J. WAIN
	21 (Braenderup)	unbekannt (Dänemark)	DVI

Tabelle 25: eBurstGroup 36

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
321 (Muenster)	374 (Muenster)	Mensch (unbekannt)	M. ACHTMAN
	478 (Muenster)	Fleisch (Deutschland)	S. BRISSE

Tabelle 26: eBurstGroup 38

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Wirt (Land)	Referenz
515 (Johannesburg) 512 (Urbana)	471 (Johannesburg)	unbekannt (USA)	L. HARRISON

Tabelle 27: eBurstGroup 49

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
411 (Chester)	411 (Chester)	unbekannt (USA)	L. HARRISON
626 (Chester)	436 (Chester)	unbekannt (Kanada)	L. HARRISON

Tabelle 28: eBurstGroup 53

beninische Stämme: ST (Serotyp)	weitere Stämme: ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
10 (Rostock)	73 (Dublin)	Rind (Frankreich)	M. TORPDHAL
	10 (Dublin)	Mensch (Schottland)	J. WAIN

Tabelle 29: eBurstGroup 67

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
524 (Give) 516 (Give)	keine		

Tabelle 30: eBurstGroup 77

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
548 (Minnesota)	285 (Minnesota)	Pute (USA)	S. BRISSE

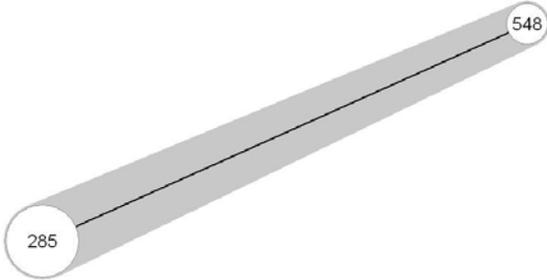


Tabelle 31: provisorische Gruppe 87

beninische Stämme ST (Serotyp)	weitere Stämme ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
550 (Poano)	557 (Poano)	unbekannt (USA)	L. HARRISON

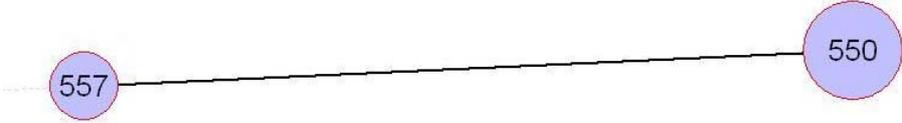
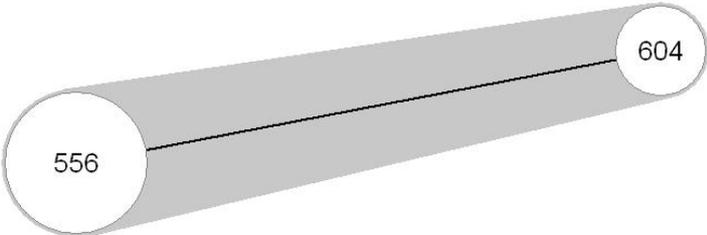


Tabelle 32: eBurstGroup 94

beninische Stämme: ST (Serotyp)	weitere Stämme: ST (Serotyp)	Herkunft: Quelle (Land)	Referenz
604 (Kodjovi, Spp.I monophas.) 556 (Kodjovi, Spp.I monophas)	keine		



Wie in den Tabellen 21 bis 32 zu sehen ist, gehören diejenigen Stämme, die zusammen eine evolutionäre Gruppe bilden, auch häufig dem gleichen Serotypen an:

- *eBurstGroup* 9: S. Virchow (ST16, 38, 181, 303, 326, 359, 618)
- *eBurstGroup* 13: S. Typhi (ST1, 2, 3, 8)
- *eBurstGroup* 24: S. Braenderup (ST21, 22, 194, 311)
- *eBurstGroup* 36: S. Muenster (ST321, 374, 478)
- *eBurstGroup* 49: S. Chester (ST411, 436, 626)
- *eBurstGroup* 67: S. Give (ST516, 524)
- *eBurstGroup* 77: S. Minnesota (ST285, 548)
- provisorische Gruppe 87: S. Poano (ST550, 557)

Ein Vergleich von unterschiedlichen Serotypen innerhalb einer evolutionären Gruppe zeigt, dass sich die Antigenformeln der Stämme häufig ähneln und nur in einer der beiden H-Phasen oder der O-Phase unterscheiden:

- *eBurstGroup* 16: S. Nima < 28 : y : 1,5 > (ST520),
S. Pomona < 28 : y : 1,7 > (ST451, 514, 520) und
S. Gatow < 6,7 : y : 1,7 > (ST536)
- *eBurstGroup* 38: S. Johannesburg < 1,40 : b : e,n,x > (ST471, 515) und
S. Urbana < 30 : b : e,n,x > (ST512)
- *eBurstGroup* 53: S. Rostock < 1,9,12 : g,p,u : - > (ST10) und
S. Dublin < 1,9,12[Vi] : g,p : - > (ST10, 73)
- *eBurstGroup* 94: S. Kodjovi < 47 : c : 1,6 > (ST556, 604) und
Sppl monophas. Var. < 47 : c : - > (ST556, 604)

Isolate, die in ihrem ST deutlich abwichen von den Allel-Kombinationen anderer Isolate desselben Serotypen wurden erneut serotypisiert (Tab. 12).

3.4. Nachweis der *Salmonella outer proteins* (Sop)

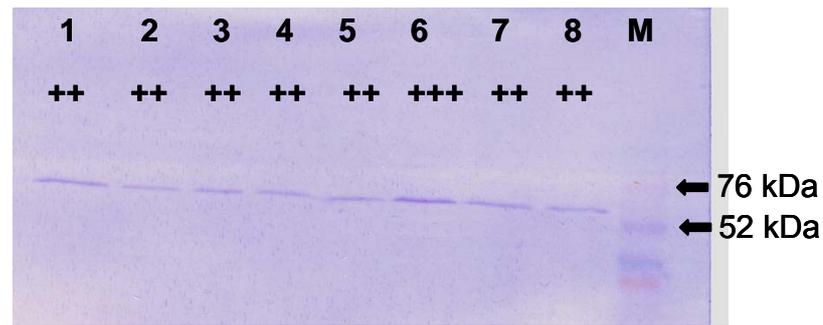
3.4.1. Vorhandensein der *sop*-Gene

Mittels Kolonie-PCR wurde überprüft, welches Repertoire an den ausgewählten Virulenzgenen *avrA*, *sopB*, *sopD*, *sopE1* und *sopE2* in den 62 untersuchten Stämmen vorzufinden ist. Als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der Virulenzgen-Fragmente wurde eine Bakteriensuspension in der PCR-Reaktion eingesetzt. Nach der Amplifikation der *avrA*-, *sopB*-, *sopD*-, *sopE1* und *sopE2*-Genfragmente wurden die PCR-Produkte im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der PCR-Nachweis für die untersuchten Gene *sopB*, *sopD*, *sopE1*, *sopE2* und *avrA* ergab, dass alle untersuchten Stämme sowohl über das *sopB*- als auch *sopD*- und *avrA*-Gen verfügen. Der Nachweis für das *sopE1*-Gen hingegen blieb bei ca. 21 % der Stämme negativ.

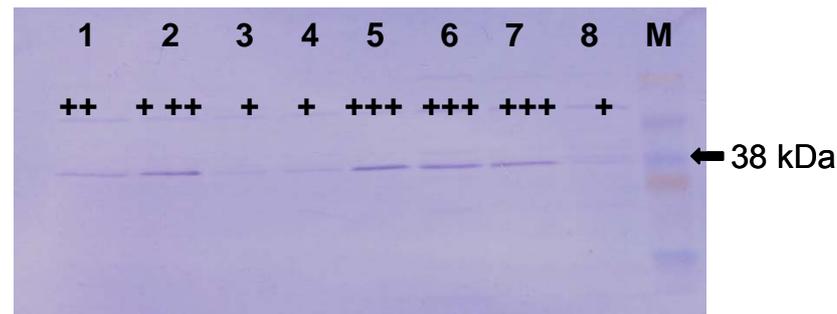
3.4.2. Expressions-Untersuchungen der Sop

Mit Hilfe von Western-Blots wurde für die untersuchten Stämme die Translation und letztendlich die Sekretion der Virulenz-assoziierten Effektorproteine AvrA, SopB, SopD, SopE1 und SopE2 über das Typ III-Sekretion-System in den Kulturüberstand nachgewiesen. Die Sekretion der Proteine wurde durch Zugabe von zusätzlich 0,3 M NaCl zum LB-Flüssigmedium stimuliert. Um den Sauerstoffgehalt zu verringern wurden die Bakterien bei nur 100 rpm geschüttelt (s. 2.5.2). Dadurch können offenbar Stressbedingungen simuliert werden, wie sie im Darm bei der Besiedlung mit Salmonellen vorkommen. Die sekretierten Proteine wurden nach Isolierung aus dem Kulturüberstand in einer denaturierenden SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des *semi-dry* Blot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch die spezifische Bindung eines polyklonalen Antikörpers an die Effektorproteine und anschließender Färbung mittels alkalischer Phosphatase konnten die Effektorproteine detektiert (Abb. 16) und Expressions-Muster für die einzelnen untersuchten Stämme ermittelt und verglichen werden (Tab. 33). Die Ergebnisse wurden,

wie von STRECKEL *et al.* (2004) beschrieben, semi-quantitativ ermittelt. In Abbildung 16 sind exemplarisch für dieses Vorgehen Western Blots für die Effektorproteine SopB und SopD dargestellt. Die Ergebnisse aller durchgeführten Western-Blot Analysen für die ausgewählten Virulenzfaktoren sind in den Tabellen 33 und 35 (Anhang 11.2.) aufgelistet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass insgesamt 93 % der untersuchten Stämme das Effektorprotein SopB exprimierten, 65 % SopD, 29 % SopE1, 11 % SopE2 und nur 5 % AvrA. Die verschiedenen ermittelten Expressionsmuster wurden mit Nummern versehen, um den Vergleich verschiedener Stämme zu vereinfachen. Die Nummer des „Expressions-Typen“ ist in der letzten Spalte von Tabelle 33 angegeben. Insgesamt ließen sich die 62 untersuchten Stämmen 12 verschiedenen Expressions-Typen zuordnen. Bei 40 % der untersuchten Stämme kam der Expressions-Typ 1 vor, der das folgende Expressionsmuster aufweist: SopB und SopD werden exprimiert, SopE1, SopE2 und AvrA werden nicht exprimiert. Eine Korrelation zwischen Serotypen oder Sequenztypen und den verschiedenen Expressionstypen ließ sich nicht feststellen. Ein Vergleich der Expressionstypen der im November 2003 in dem Dorf Kaki Koka aus Wasser und aus Stuhl der Dorfbewohner isolierten Stämme zeigte keine Korrelation zwischen Expressionstyp und Herkunft (Tab. 34). Für die sechs der aus Wasser und die sechs aus Stuhl isolierten Stämme konnten jeweils drei Expressionstypen ermittelt werden (Wasser: 1, 2, 9 und Stuhl: 1, 8, 9). Allerdings fällt auf, dass nur einer der Stämme aus Stuhl (30 st.163, S. Sangera) SopD exprimierte, wohingegen fünf von sechs Stämmen aus Wasser dieses Effektorprotein exprimierten. Drei der sechs Stämme aus Stuhl zeigten eine positive Expression von SopE2, das bei keinem der wassergebundenen Stämme nachgewiesen wurde und insgesamt nur von 11 % der untersuchten Stämme exprimiert wird.



a)



b)

Abbildung 16: Semi-quantitativer Expressions-Nachweis der Virulenz-Faktoren SopB und SopD mittels Western Blot.

a) SopB (62 kDa) und b) SopD (36 kDa) jeweils für die folgenden Stämme: Spur 1: 118 TIR-8 (S. Give), Spur 2: 117 YAT-14 (S. Give), Spur 3: 106 VAN-15 (S. Nima), Spur 4: 54 DJE-5 (S. Nima), Spur 5: 39 SUB-4 (S. Give), Spur 6: 38 THI-44 (S. Give), Spur 7: 24 SUB-65 (S. Give), Spur 8: 12 DJE-5 (S. Pomona), M= Protein-Marker (Amersham™ High Range Rainbow Marker RPN756E)

Tabelle 33: Ergebnisse der Expressions-Untersuchungen der Virulenz-assoziierten Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA. Jedem ermittelten Expressionsmuster wurde eine Nummer (Expressionstyp) zugeordnet. Für acht Stämme konnte aufgrund fehlender SopB-Ergebnisse kein vollständiges Expressionsmuster erhalten werden.

Serotyp	Stamm*	ST (MLST)	SopB	SopD	SopE1	SopE2	AvrA	Expressions-Typ
Give	34 PAR-39	524	+++	++	+	-	-	2
Give	38 THI-44	524	+++	+++	-	-	-	1
Give	37 PAR-39	524	+++	++	-	-	-	1
Give	35 SUB-13	516	+++	+++	-	-	-	1
Give	24 SUB-65	516	+++	+++	-	-	-	1
Give	39 SUB-4	516	++	+++	-	-	-	1
Give	117 YAT-14	516	++	+++	-	-	-	1
Give	118 TIR-10	516	++	++	-	-	-	1
Give	41 GOUM-11	516	n.d.	+++	-	-	+	

Serotyp	Stamm*	ST (MLST)	SopB	SopD	SopE1	SopE2	AvrA	Expressions-Typ
Give	40 BG-61	516	+++	+++	-	++	+	3
Give	124 KOB-8	516	+++	+++	-	-	-	1
Muenster	105 VAN-12	321	++	+	-	-	-	1
Muenster	22 PAR-42	321	+++	-	+	-	-	4
Muenster	21 SUB-17	321	-	-	-	-	-	5
Muenster	50 SUB-5	321	++	-	-	-	-	6
Muenster	52 SEB-M2	321	++	-	-	-	-	6
Luke	46 PAR-87	517	-	-	++	+	-	7
Luke	122 WEW-3	517	++	++	++	-	-	2
Luke	127 KPES-1	517	+	++	+	-	-	2
Luke	47 PAR-88	517	+	+	-	-	-	1
Sangera	30 st.193	527	+++	++	-	-	-	1
Sangera	23 st.163	527	+	-	-	-	-	9
Elisabethville	85 KAK-3	518	+++	+++	++	-	-	2
Elisabethville	97 SEB-2	518	++	+++	+++	-	-	2
Elisabethville	82 KAK-S	518	+++	+++	-	-	-	1
Elisabethville	96 YEB-56	518	n.d.	+++	++	-	-	
Koketime	45 KAK-S	519	+	+	-	-	-	1
Koketime	81 KAK-S	519	++	+	-	-	-	1
Nima	120 KAK-SS	521	+++	++	+	-	-	2
Nima	51 st. THEK.	521	+	-	-	-	-	9
Nima	55 SUB-22	520	++	++	-	-	-	1
Nima	54 DJE-5	520	++	+	-	-	-	1
Nima	106 VAN-15	520	++	+	-	-	-	1
Rubislaw	59 KAW-M4	553	++	-	+	-	-	4
Hofit	56 DEN-M1	553	++	-	+	-	-	4
Rostock	57 DEN-2	10	+++	-	+++	-	-	4
Spp.I monophas.	65 PAR-35	556	n.d.	-	-	-	-	
Spp.I monophas.	66 PAR-35	556	n.d.	-	-	-	-	
Spp.I monophas.	67 PAR-41	556	n.d.	-	-	-	-	
Spp.I monophas.	68 YAT-7	556	+++	+	-	-	-	1
Takoradi	74 YEB-7	531	+++	+	++	-	+	11
Takoradi	92 VAN-24	531	-	-	-	-	-	5
Takoradi	93 VAN-24	531	++	+	+	-	-	2
Takoradi	108 THI-2	531	-	-	+	-	-	12
Takoradi	111 DOG-F.	531	+++	++	+++	-	-	2
Bredeney	13 KOB-M	306	n.d.	++	-	-	-	

Serotyp	Stamm*	ST (MLST)	Expressions-Typ					Expressions-Typ
			SopB	SopD	SopE1	SopE2	AvrA	
Bredeney	103 VAN-22	306	n.d.	+	-	-	-	-
Chester	15 WAS-1	411	++	+	-	-	-	1
Cubana	6 st.64	525	++	-	-	++	-	8
Waycross	7 st.109	526	++	-	-	+	-	8
Typhi	76 st.198	2	+++	-	-	-	-	9
Offa	20 st.116	528	+++	-	-	++	-	8
Johannesburg	43 KAK-9	515	+++	+	++	-	-	2
Amoutive	5 KAK-SR	529	++	-	-	-	-	9
Typhimurium	77 SAN-4	513	+	++	++	-	-	2
Pomona	12 DJE-5	520	+++	+	-	-	-	1
Teshie	75 KAK-3	530	+++	+++	-	-	-	1
Apapa	1 SEB-14	551	+++	++	-	+	-	10
Benue	2 FOM-2	561	+++	++	-	++	-	10
Chandans	4 PAR-79	465	++	-	-	-	-	9
Cotham	18 GREG	617	+++	++	-	-	-	1
Spp.I monophas.	70 DAM-M	560	n.d.	-	-	-	-	-

* die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserquelle bzw. der Nummer der Stuhlprobe zusammen

Tabelle 34: Vergleich der Expressionsmuster der 2003/2004 in Kaki Koka aus Wasser und aus Stuhl isolierten *Salmonella*-Stämme (M. JOST, unveröffentlichte Daten). Stämme aus Wasserproben sind blau und aus Stuhlproben rot markiert.

Serotyp <i>Salmonella</i>	Stamm* (Wasser/Stuhl)	ST (MLST)	Expressions-Typ					Expr.-Typ
			SopB	SopD	SopE1	SopE2	AvrA	
Johannesburg	43 KAK-9	515	+++	+	++	-	-	2
Amoutive	5 KAK-SR	529	++	-	-	-	-	9
Elisabethville	82 KAK-S	518	+++	+++	-	-	-	1
Koketime	45 KAK-S	519	+	+	-	-	-	1
Teshie	75 KAK-3	530	+++	+++	-	-	-	1
Nima	120 KAK-SS	521	+++	++	+	-	-	2
Cubana	6 st.64	525	++	-	-	+++	-	8
Waycross	7 st. 109	526	++	-	-	+	-	8
Sangera	30 st.163	527	+++	++	-	-	-	1
Sangera	23 st.193	527	+	-	-	-	-	9
Typhi	76st. 198	2	+++	-	-	-	-	9
Offa	20 st.116	528	+++	-	-	++	-	8

* die Stammbezeichnungen setzen sich aus der Probennummer und der Abkürzung der Wasserquelle bzw. der Nummer der Stuhlprobe zusammen

3.5. Darstellung der Ergebnisse in dem IS SalmEau

Auf Grundlage der IMPETUS-Brunnendatenbank und der Ergebnisse der Wasseruntersuchungen auf Salmonellen wurde das Informationssystem (IS) SalmEau (Kontamination von Wasserstellen durch enteritische Salmonellen im oberen Ouémé Einzugsgebiet, Benin) entwickelt (<http://de.geopublishing.org/demo>). Es bietet dem Nutzer die Möglichkeit, einzelne Brunnen, in deren Wasser seit 2002 Kontaminationen durch enteritische Salmonellen nachgewiesen werden konnten, in einem digitalen Atlas auszuwählen und sowohl die Brunnen- als auch die Stamm-Informationen der Salmonellen abzufragen. Es werden Fotos der Brunnen angezeigt, Informationen zur Erbauung, dem Durchmesser und der Tiefe sowie dem Brunnentypen (modern oder traditionell) angegeben, das Beprobungsdatum, die Sero- und Sequenztypen sowie Antigenformeln der nachgewiesenen Salmonellen. Abbildung 17 zeigt, wie das Beprobungsgebiet in SalmEau dargestellt wird. Die durch Salmonellen kontaminierten Brunnen sind durch einzelne blaue Punkte markiert, die sich auswählen lassen, um Informationen abzufragen.

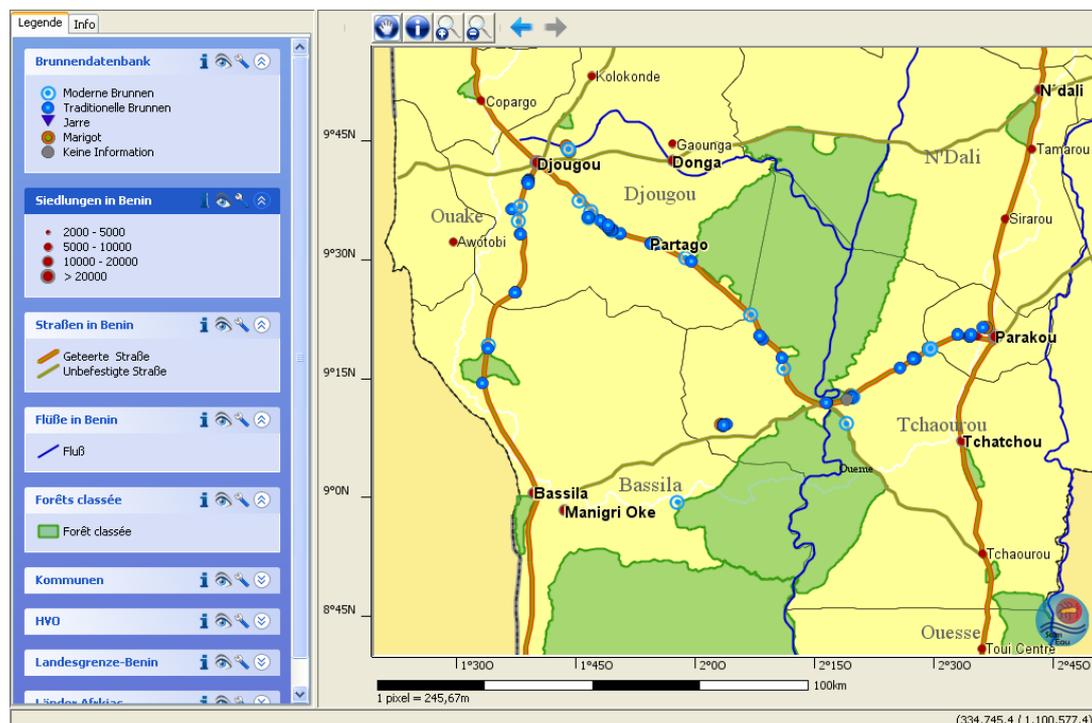


Abbildung 17: Graphische Darstellung der durch Salmonellen kontaminierten Brunnen im Untersuchungsgebiet in dem Informationssystem SalmEau.

4. Diskussion

4.1. Infektionsrisiko für die Wasserkonsumenten

In der Literatur werden Ausbrüche wassergebundener Infektionserkrankungen, hervorgerufen durch enteritische Salmonellen, nur sehr selten beschrieben (BAUDART *et al.* 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass von den Umwelt-Salmonellen, die aus Trinkwasserquellen in Benin isoliert wurden, ein Infektionsrisiko für die Konsumenten des kontaminierten Wassers ausgeht. Der Nachweis der ausgewählten Pathogenitätsfaktoren *Salmonella outer proteins* (Sop) ergab für fast alle untersuchten Stämme (93 %) einen positiven Nachweis des Effektorproteins SopB, das als Inositolphosphat-Phosphatase eine zentrale Rolle im Infektionsverlauf einnimmt (GALYOV *et al.* 1997, WOLF 2004, WALLIS und GALYOV 2000). Für Stämme, die SopB exprimieren, kann auf Grundlage der von STRECKEL *et al.* (2004) und PRAGER *et al.* (2003) durchgeführten Studien davon ausgegangen werden, dass sie potenziell pathogen sind (persönliche Mitteilung von Prof. H. Tschäpe und W. Streckel, RKI 2008). Durch die Auswertung der auf Grundlage der MLST-Daten erstellten Populationsstruktur (s. 3.3.4) konnte eine Zuordnung der beninischen Stämme in hauptsächlich aus Umwelt-Isolaten oder rein afrikanischen Stämmen bestehenden Gruppen nicht festgestellt werden. Es wurde eine große Anzahl verschiedener Sequenztypen ermittelt, die im Vergleich mit der globalen MLST-*S. enterica* Datenbank häufig auch nahe Verwandtschaft zu Stämmen aufweisen, die im Zusammenhang menschlicher Infektionen isoliert wurden (Tab. 21, 23, 24, 25, 28). Selbst wenn die Salmonellen im Wasser nur in geringer Keimdichte vorliegen, verdeutlichen die widersprüchlichen Angaben zur Infektions-Dosis (Tab. 3), dass nicht zwangsläufig eine große Anzahl von Zellen enteritischer Salmonellen aufgenommen werden muss, um eine Infektion hervorzurufen. Faktoren wie der Immunstatus des Konsumenten und die Verarbeitung kontaminierten Wassers in Lebensmitteln können das Infektionsrisiko ebenfalls erhöhen (CARLSON 2000, MASTROENI und MASKELL 2006). Die in dem Dorf Kaki Koka im Jahr 2008 durchgeführten Untersuchungen von Stuhlproben der

Wasserkonsumenten (KRÖGER 2008, ZOBEL 2008) ergaben, dass bei 6,5 % der untersuchten Probanden der aus dem Stuhl isolierte Serotyp mit dem Serotypen übereinstimmte, der zeitgleich in der Wasserquelle des Keimträgers nachgewiesen werden konnte. Die hohe Anzahl an Durchfallerkrankungen in Benin, die durch die in repräsentativen Dörfern durchgeführten Umfragen (s. 3.1.2.) bestätigt wurden, können aufgrund dieser Ergebnisse auch auf Trinkwasserkontaminationen durch enteritische Salmonellen zurückgeführt werden. Laut WHO-Angaben waren Durchfall-Erkrankungen bei Kindern unter 5 Jahren im Jahr 2000 mit 17,1 % die viert-häufigste Todesursache (nach Malaria: 27,2 %; Perinatale Ursachen: 25,0 % und Pneumonie: 21,1%) (WHO 2006).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich die dringende Notwendigkeit, im ländlichen Raum Benins eine Umstrukturierung der Wasserversorgung zu erreichen, die das Risiko für den Erwerb wasserabhängiger Infektionserkrankungen nachhaltig senkt. Hierfür steht die Installierung von Pumpanlagen und AEV in ausreichender Menge zur Versorgung der Bevölkerung mit genusstauglichem Wasser an erster Stelle.

4.2. Trinkwasser im oberen Ouémé Einzugsgebiet

4.2.1. Die Trinkwasserhygiene

Aufgrund unzureichender wasserhygienischer Maßnahmen kommt es in Benin immer wieder zu Choleraepidemien: 2001 in Parakou mit 40 Toten, 2003 im Departement Borgou mit 265 Erkrankten und 3 Toten (WHO 2007) und zuletzt im Jahr 2008 in Cotonou mit 503 Erkrankten und 2 Toten (WHO 2008b). Im Verlauf dieser letzten Epidemie wurde der Erreger der Cholera, *Vibrio cholerae* in offenen Brunnenanlagen in Cotonou von Mitarbeitern des IMPETUS-Labors nachgewiesen. Mehr als 70 % aller Trinkwasserquellen im oberen Ouémé Einzugsgebiet weisen Kontaminationen durch *E. coli* auf (SAUTER 2006; UESBECK *et al.* 2008) und im Rahmen dieser Arbeit wurde in ca. 8 % der untersuchten Wasserquellen *Salmonella enterica* als zusätzlicher Indikatorkeim nachgewiesen. Diese Befunde sind auf mangelnde Trinkwasserhygiene zurückzuführen. Obwohl Befragungen

gezeigt haben, dass beninischen Dorfbewohnern die wichtige Rolle von Hygiene-Maßnahmen (Lebensmittel- und Körperhygiene sowie ein sauberes Wohn-Umfeld) bezüglich der Prävention von Krankheiten bewusst ist (KLEIN 2005), bot sich bei den Beprobungsfahrten häufig das Bild einer völlig unzureichenden Trinkwasserhygiene. Es gibt viele frei herumlaufende Tiere (Abb. 18 c) - besonders Ziegen, Schafe, Hühner, Hunde, Enten und in einigen Dörfern viele Schweine - die die Brunnumgebung durch ihre Exkrememente verschmutzen. Da die traditionellen Brunnen, die mit knapp 80 % den Großteil der zur Verfügung stehenden Trinkwasserquellen ausmachen (Tab. 9, Abb. 2 a) und Abb. 3), - wenn überhaupt - nur sehr niedrige, häufig zerfallene Mauern aus Lehm besitzen, stellt der horizontale Eintrag von Kontaminationen ein großes Problem dar. Eine Abdeckung der Brunnen erfolgt oft nur durch ein paar lose Holzstücke oder Wellblech. Die Schöpfgefäße (*puisette*), schwarze Kunststoffbehälter, die an einem Seil von Hand eingeholt werden und häufig nach Gebrauch neben den Brunnen auf den Boden geworfen werden, (Abb. 18 b), stellen eine weitere Ursache für Kontaminationen und Rekontaminationen der Brunnen dar (MAKOUTODE *et al.* 1999). Salmonellen, *E. coli* und andere Erreger aus tierischen Fäkalien, die sich auf dem Boden rund um die Brunnen befinden können auf diesem Weg ins Wasser gelangen. Desweiteren ist es auch möglich, dass Tiere direkt in die Brunnen fallen.

Die Auswertung der Latrinendatenbank zeigt, dass es nur in zwei Dritteln aller Dörfer überhaupt Zugang zu den grundlegendsten sanitären Einrichtungen wie Latrinen gibt. Viele der registrierten Latrinen befinden sich außerdem in einem sehr desolaten Zustand (Abb. 8) oder sind derart defekt, dass sie laut Aussagen der Dorfbewohner nicht mehr genutzt werden können. Nach Angaben des *Institut National de la Statistique et de L'Analyse Économique* (INSAE) haben in Benin mehr als sechs von zehn Haushalten keine Toiletten (INSAE 2004). Ein Kanalisationssystem existiert in den Dörfern Benins nicht. Die meisten Häuser verfügen über kleine mit brusthohen Mauern abgetrennte Bereiche, die als Dusche dienen und zum Teil auch zum Urinieren genutzt werden. In ihnen steht ein Tongefäß mit Wasser, das für die persönliche Hygiene verwendet wird (KLEIN 2005). Alternativ nutzen die Dorfbewohner die umliegende Vegetation („*brousse*“),

um auszutreten. Bei stärkeren Niederschlagsereignissen - die in der von April bis Mitte Oktober anhaltenden Regenzeit häufig vorkommen - entsteht regelmäßig Oberflächenabfluss, über den Fäkalien und Unrat aus der Umgebung in das Wasser der traditionellen Brunnen gelangen kann, deren Brunnenmauer oder Brunnenfassung defekt oder nicht existent sind (Abb. 18).

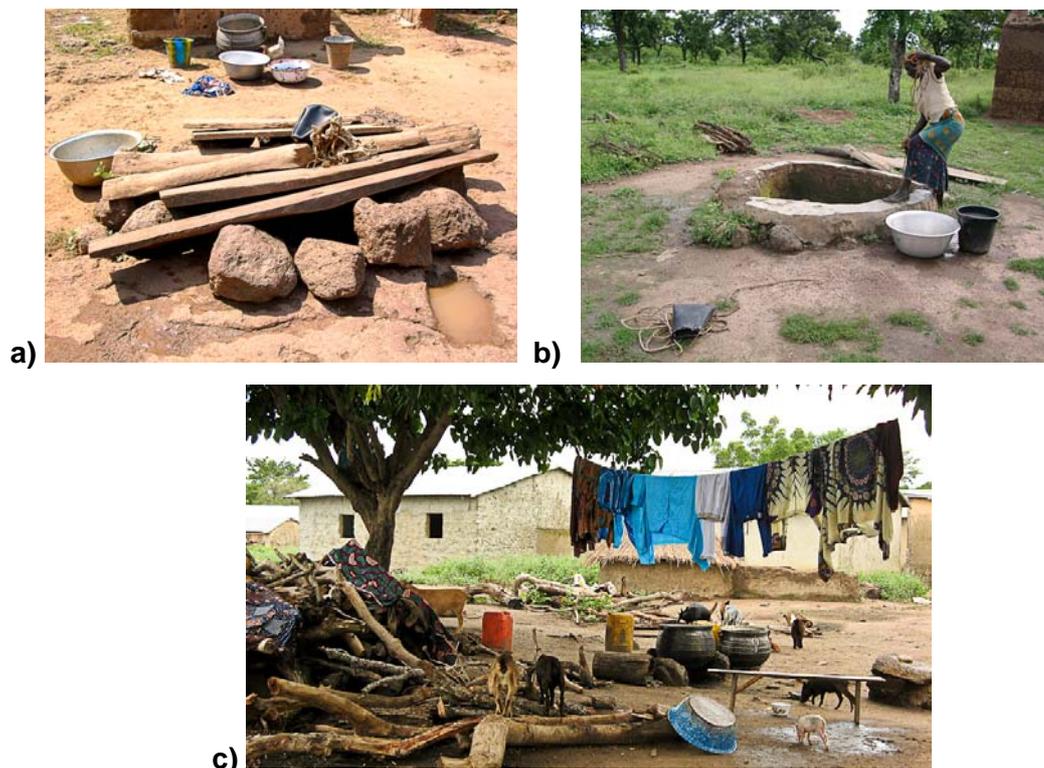


Abbildung 18: Mangelnde Trinkwasserhygiene. **a)** und **b)**: Traditionelle Brunnen mit defekten Brunnenmauern und fehlenden Brunnenfassungen, **a)** notdürftige Abdeckung durch Bretter, **b)** eine Frau schöpft Wasser, im Vordergrund liegt eine *puisette* (Schöpfgerät) auf dem Boden und neben dem Brunnen steht eine Schüssel, in der das Wasser transportiert wird, **c)** zwischen Kochtöpfen und Wasserschüsseln frei herum laufenden Tiere in einem Innenhof.

Auch moderne Brunnen sind aufgrund der zuvor aufgeführten fehlenden Hygienestandards vor Kontaminationen durch Salmonellen nicht geschützt, obwohl sie durch ihre baulichen Eigenschaften (Deckel, befestigte Schöpfvorrichtung, betonierte Brunnenfassung) deutlich geschützter vor dem Eintrag von Kontaminationen durch Regen- oder Sickerwasser sind, als traditionelle Brunnen. In Abbildung 10 sind zwei von insgesamt 17 modernen Brunnen dargestellt, die sich in einem äußerlich einwandfreien Zustand befinden, in deren Wasser dennoch jeweils zwei Mal Salmonellen nachgewiesen werden konnten. Der Bau moderner Brunnen kann auch aufgrund der nachgewiesenen Kontaminationen durch *E. coli* nicht als

Beitrag zur Versorgung der ländlichen Bevölkerung mit unbedenklichem Trinkwasser gesehen werden.

Obwohl Wasser aus Pumpenanlagen im Rahmen der bakteriologischen Untersuchungen keine Kontaminationen durch *E. coli* oder Salmonellen aufwies, haben vom IMPETUS-Labor durchgeführte Untersuchungen zur virologischen und chemischen Trinkwasserqualität ergeben, dass es Kontaminationen durch Adeno- und Rotaviren aufweisen kann, wenn sich die Pumpe in einem Radius von weniger als 50 m um eine Latrine befindet (VERHEYEN *et al.* 2009). Chemische Wasseranalysen haben gezeigt, dass knapp 13 % aller untersuchten Pumpenwasser Nitratkonzentrationen aufweisen, die den Grenzwert von 50 mg/L (BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ 2001) überschreiten (IMPETUS-Labor, unveröffentlichte Daten). Derartige Nitratkonzentrationen traten ebenfalls in Abhängigkeit der Entfernung zu Latrinen oder gedüngten Feldern auf (PROJET HYGIÈNE, ASSAINISSEMENT DE BASE ET EAU POTABLE 2008).

Manche Regierungs- (z.B. DHAB) und Nicht-Regierungs-Organisationen (z.B. Caritas) führen in den Dörfern für moderne Brunnen sporadisch Wasser-Desinfektionen mit Chlor durch. Untersuchungen, die vom IMPETUS-Labor begleitend zur solchen Sanierungsmaßnahmen durchgeführt wurden ergaben, dass bereits wenige Tage nach erfolgreicher Entkeimung des Wassers erneute Fäkalkontaminationen festgestellt werden konnten (UESBECK *et al.* 2008). In einem Fall konnten sogar zwei Wochen nach erfolgter Sanierung Salmonellen im Wasser nachgewiesen werden. Gelegentlich durchgeführte Wasserdesinfektionen sind also für Benin keine Lösung, um die bakteriologische Wasserqualität von Brunnen nachhaltig zu verbessern. Hinzu kommt, dass mit der Chlorung von Wasser auch Gefahren verbunden sind, wie die Entstehung unerwünschter und unter Umständen kanzerogener Desinfektionsnebenprodukte (ERREN *et al.* 2003). Beispielsweise kann das als Mutagen X oder MX bekannte kanzerogene 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-Furanon als Nebenprodukt von Chlor-Desinfektionen entstehen, wenn Chlor mit Huminsäuren im Wasser reagiert (MCDONALD und KOMULAINEN 2005).

4.2.2. Transport und Wasserlagerung auf Haushaltsebene

Wie die von LAGNIKA (2008) im IMPETUS-Labor in Parakou durchgeführten Untersuchungen zur Kontaminationsgefahr von bakteriologisch einwandfreiem Wasser durch Transport und Lagerung gezeigt haben, reicht die Realisierung von ausreichend Pumpenanlagen alleine nicht aus, um gewährleisten zu können, dass die Menschen bakteriologisch unbedenkliches Wasser trinken. Sehr häufig gelangen Fäkalkontaminationen während des Transportes oder der Lagerung auf Haushaltsebene in das Trinkwasser. Die Frauen, die das Wasser in großen offenen Schüsseln (Abb. 18 b) auf dem Kopf von der Wasserstelle zum Haushalt transportieren, legen häufig Zweige oder ein Stück Stoff in das Wasser, um ein Überschwappen während des Laufens zu verhindern (LAGNIKA 2008, MAKOUTODE *et al.* 1999). LAGNIKA (2008) hat über einen Zeitraum von 12 Monaten die wasserhygienische Situation von 55 Haushalten untersucht, die ihr Wasser ausschließlich aus geschlossenen Pumpensystemen bezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass gelagertes Trinkwasser in 45 % der untersuchten Haushalte nach 24 h Kontaminationen durch *E. coli* aufwies. In zwei Haushalten in dem Dorf Guinlerou konnten sogar Kontaminationen durch enteritische Salmonellen (*S. Blukwa* ST 620, *S. Luke*, ST 517) (Tab. 10) im gelagerten Wasser festgestellt werden. In Benin werden typischerweise große Tonkrüge (Abb. 4 a) zur Wasserlagerung genutzt, die sich meistens vor den Häusern befinden und aus denen die Familienmitglieder das Wasser mit Hilfe einer halben Kalebassen-Schale oder einer Plastikschißsel direkt schöpfen. Durch die vielen frei herumlaufenden Tiere ist es für die Frauen nicht immer einfach, Haushaltsgeräte, Lebensmittel und Wasserkrüge vor diesen zu schützen (KLEIN 2005).

4.2.3. Das siebte UN Millennium Development Goal

Das siebte *Millennium Development Goal* (MDG7) der Vereinten Nationen „*Reduce by half the proportion of people without access to safe drinking water and basic sanitation*“ (United NATIONS 2001) sieht vor, die Zahl von Menschen ohne Zugang zu sauberem Trinkwasser bis ins Jahr 2015 zu

halbieren. Die von der WHO festgelegte Definition von Trinkwasser lautet folgendermaßen: „...*drinking-water should not contain any microorganisms known to be pathogenic – capable of causing disease – or any bacteria indicative of faecal pollution. To ensure that a drinking water supply satisfies these guidelines, samples should be examined regularly.*“ (WHO 1997). Wird diese Definition bei der Umsetzung des MDG7 berücksichtigt, so ist die Umsetzung für Zentral-Benin ein sehr ehrgeiziges Ziel, da die Mehrzahl aller offenen Brunnen im oberen Ouémé-Einzugsgebiet mit *E. coli* und knapp ein Zehntel mit enteritischen Salmonellen kontaminiert ist. Es sind zwar seit 2001 46 neue Pumpen im Untersuchungsgebiet installiert worden, die bakteriologisch unbedenkliches Wasser liefern, aber das Verhältnis von Brunnen (2001 und 2008 jeweils 90 % der Gesamt-Wasserquellen) zu geschlossenen Pumpenanlagen (2001: 5,2 % und 2008: 6,0 %) ist fast unverändert geblieben (Tab. 9). Im Rahmen der Umfrage zur Trinkwassersituation wurde in 86 % der Dörfer der Zugang der Einwohner zu sauberem Trinkwasser als noch unzureichend bezeichnet (s. 3.1.2). Die Auswertung der Brunnendatenbank hat gezeigt, dass es nach wie vor in vielen Dörfern (n ~ 40) überhaupt keinen Zugang zu einer Pumpe gibt. Das Wasser aus traditionellen und modernen Brunnen fällt nicht unter die oben genannte Definition von Trinkwasser der WHO oder der deutschen Trinkwasserverordnung. Im Wasser mehrerer moderner Brunnen konnten Kontaminationen durch enteritische Salmonellen nachgewiesen werden (s. 3.2.1 und Tab. 10). Dennoch sind seit 2001 durch die Finanzierung internationaler Organisationen 65 neue moderne Brunnen im Untersuchungsgebiet gebaut worden (Tab. 9).

Die beiden Departements des oberen Ouémé Einzugsgebietes, Borgou und Donga, zeichnen sich durch ein sehr starkes Bevölkerungswachstum aus (Borgou: 3,5 % und Donga: 2,5 %) (HELDMANN 2008b), wodurch die Zunahme an einfachen traditionellen Brunnen (n = 481) im Laufe der vergangenen sechs Jahre erklärt werden kann (Tab. 9). Modellrechnungen haben ergeben, dass die Bevölkerung bis zum Jahr 2025 im Borgou von 725 171 (2002) auf 1 608 618 Menschen und in Donga von 350 062 auf 585 278 Menschen anwachsen wird (persönliche Mitteilung M. Heldmann). Die Frequenz der Installierung sicherer Trinkwasserquellen

müsste sich also im Vergleich zu den vergangenen Jahren drastisch erhöhen, um das siebte *Millenium Development Goal* im oberen Ouémé Einzugsgebiet noch realisieren zu können. Um außerdem zukünftig in Benin nicht nur die Wasserversorgung, sondern auch die Versorgung der Bevölkerung mit unbedenklichem Trinkwasser gewährleisten zu können, muss die Trinkwasserqualität besser kontrolliert werden, so dass ein verstärkter Ausbau von Wasseranalytiklaboratorien unabdinglich ist. Bislang gibt es in Benin nur sehr wenige Strukturen, die Wasseranalysen durchführen: die Laboratorien der Wasserwerke SONEB (*Société Nationale des Eaux du Bénin*) in Parakou und Cotonou, das Labor des Gesundheitsministeriums und das Wasseranalytiklabor der nationalen Wasserbehörde DG-Eau in Cotonou, in dem aber bislang ausschließlich chemische Wasseranalysen durchgeführt wurden. Diese Laboratorien befinden sich fast ausschließlich im Süden des Landes. Initiativen zu gebietsübergreifenden bakteriologischen Wasserkontrollen hat es bislang - außer der von IMPETUS initiierten Feldkampagne - in Benin nur sehr wenige gegeben, die außerdem sämtlich im Süden des Landes durchgeführt wurden (BOSSOU 2001, MAKOUTODE *et al.* 1999, DEGBEY *et al.* 2008, FOLAL und GONOU 2002). Darüber hinaus haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass allein der Zugang zu sauberem Trinkwasser nicht gewährleistet, dass die Menschen auch bakteriologisch unbedenkliches Wasser konsumieren (LAGNIKA 2008, GUNDRY *et al.* 2006, MAGGY UND KALENI 2002, WRIGHT *et al.* 2004). Den Menschen in entlegenen, ländlichen Gebieten in Benin müssen ebenfalls sichere Alternativen zu einfachen, offenen Tonkrügen für die Wasserlagerung (THOMPSON *et al.* 2003, MINTZ *et al.* 2001) und gegebenenfalls, wie von QUICK *et al.* (2002) für Untersuchungen in Zambia beschrieben, Desinfektionsmittel zur Entkeimung des gelagerten Wassers zur Verfügung gestellt werden. Eine Verbesserung der wasserhygienischen Situation muss durch vermehrte Schulungen und Aufklärungs-Kampagnen propagiert werden (STANTON *et al.* 1992), um ein Bewusstsein für die Zusammenhänge von Wasserhygiene und Durchfallerkrankungen zu schaffen.

4.3. Beninische *Salmonella* Isolate

4.3.1. Aus Wasser isolierte Stämme

Da der Nachweis von Salmonellen im Wasser auch positiv ausfallen kann, wenn *E. coli* und coliforme Bakterien nicht nachgewiesen werden (CARLSON 2000, SAUTER 2006), wurde für diese Arbeit *Salmonella enterica* als zusätzlicher Indikator für die Einschätzung des Infektionsrisikos der Wasserkonsumenten untersucht. In westlichen Ländern haben Trinkwasserkontaminationen durch Salmonellen aufgrund der verbesserten Trinkwasserversorgung und regelmäßig durchgeführten Kontrollen keine epidemiologische Bedeutung. Die wenigen Veröffentlichungen über wasserassoziierte Salmonellen zeigen, dass häufig viele verschiedene, selten vorkommende Serotypen aus Wasserproben isoliert wurden (BAUDART *et al.* 2000, POLO *et al.* 1999, MÜLLER und MOSSEL 1982, DIONISIO *et al.* 2000, MURAKAMI *et al.* 2001), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. POLO *et al.* (1999) konnten aus 823 Fluss-, Meer- und Frischwasserproben *Salmonella* Stämme isolieren, die zu 55 verschiedenen Serotypen gehörten, von denen *S. Virchow* nach *S. Enteritidis* am zweit-häufigsten vorkamen. DIONISIO *et al.* (2000) konnten bei einer in zwei marinen Zonen in Portugal durchgeführten Studien 17 verschiedene Serotypen identifizieren, von denen *S. Virchow* am häufigsten isoliert wurde. Von denen aus Wasser in Benin isolierten Serotypen ist *S. Virchow* mit 6,2 % nach *S. Give* (7,3 %) ebenfalls häufiger als andere Serotypen identifiziert worden. In keiner Studie wurde allerdings eine so große Serotypen-Variabilität beschrieben, wie sie in Trinkwasserstellen in Benin festgestellt wurde: 177 Stämme lassen sich 79 verschiedenen Serotypen zuordnen. Sowohl *S. Give* als auch *S. Virchow*, *S. Takoradi* und *S. Rubislaw* – vier der am häufigsten in Benin identifizierten Serotypen (Tab. 13) – wurden in der Vergangenheit im Zusammenhang mit Infektionen bei Menschen beschrieben (JANSEN *et al.* 2005, BITSORI *et al.* 2001, MARYLAND DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE 2006, WARD 2000). Ihr Vorkommen im Trinkwasser stellt also ein Risiko für die Konsumenten dar. In Benin werden - wenn überhaupt nur in Ausnahmefällen - routinemäßig in Krankenhäusern oder kleinen Privatkliniken Salmonellen aus Patienten-Material isoliert. Die Diagnose erfolgt in der Regel auf

Grundlage der beobachteten Symptome (persönliche Beobachtungen und Mitteilung des Laborleiters des Uniklinikums, Parakou). Es liegen keinerlei Daten über die Verteilung von klinischen Serotypen vor, da es kein nationales Referenzlabor gibt, das Serotypisierungen von Salmonellen durchführen könnte. Die im Rahmen von IMPETUS initiierten Stuhl-Untersuchungen in dem Dorf Kaki Koka legen allerdings den Schluss nahe, dass es sich - anders als in Deutschland und anderen europäischen Ländern - auch bei den *Salmonella* Stämmen, die in Benin Infektionen bei Menschen hervorrufen, um eine große Anzahl verschiedener Serotypen handelt (65 Isolate gehörten zu 27 verschiedenen Serotypen) (ZOBEL 2008, KRÖGER 2008). Etwa die Hälfte der aus Stuhlproben isolierten Stämme weisen einen Sero- und Sequenztypen auf, der bereits seit 2002 aus einer Wasserquelle des oberen Ouémé Einzugsgebietes isoliert wurde. Die Verteilung der infektiösen Stämme spiegelt somit zumindest teilweise das Serotypenmuster der Umwelt wider. Als mögliche weitere Keimträger der seltenen Serotypen kommen die vielen verschiedenen Tiere in Frage, die häufig unmittelbaren Kontakt zu den Wasserstellen oder aber dem gelagerten Wasser in den Haushalten haben. Eidechsen, die bekanntermaßen Träger von Salmonellen sein können (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2003; WOODWARD *et al.* 1997; GUGNANI *et al.* 1986), suchen häufig in den Brunnenschächten Schatten (persönliche Beobachtungen). Untersuchungen in Nigeria haben gezeigt, dass 27 von 90 untersuchten Geckos Träger von Salmonellen sind (OBOEGBULEM und ISEGHOMIHEN 1985). Hühner, Schweine, Rinder (VAN KESSEL *et al.* 2008), Katzen und Hunde (BORLAND 1975a, BORLAND 1975b), die sich in Benin frei bewegen und auf engstem Raum mit der Landbevölkerung leben, sind ebenfalls potenzielle Träger von Salmonellen. Für den von TAYLOR *et al.* (2000) beschriebenen Ausbruch einer wasserassoziierten Salmonellose (*S. Saintpaul*) wurden Frösche oder Mäuse als mögliche Kontaminationsquelle vermutet. Zu dem Wasser offener Brunnen in Benin haben sowohl Frösche als auch Mäuse Zugang, die somit ebenfalls für die Wasserkontaminationen durch Salmonellen verantwortlich sein könnten. In mehreren Fällen wurde durch den Nachweis übereinstimmender Sero- und Sequenztypen gezeigt, dass Salmonellen zeitgleich durch die gleiche Kontaminationsquelle in das Wasser

benachbarter Brunnen getragen wurden (Tab. 10 und Tab. 35, Anhang 11.2.) (z.B.: DEN-M1 und DEN-M5: S. Hofit, ST553, 2002; KAK-3 und KAK-S: S. Elisabethville, ST518, 25.01.2005; PAR-87 und PAR-88: S. Luke, ST517, 28.02.2004; SUB-4 und SUB-65: S. Give, ST516, 14.04.2004; KOB-8 und KOB-17: S. Give, ST516, 23.07.2007). Die in fünf ausgewählten Dörfern monatlich durchgeführten Beprobungen aller Wasserstellen (s. 2.2.1) haben gezeigt, dass Salmonellen des gleichen Sero- und auch Sequenztypen über einen Zeitraum von bis zu 82 Wochen in der gleichen Wasserstelle (KAK-S, S. Koketime, ST519) nachgewiesen werden konnten (Tab. 14). Allerdings weist der Stamm 81 KAK-S ein von den Stämmen 45 KAK-S, und 112 KAK-S abweichendes Resistenzmuster auf (vgl. 3.2.5, Tab. 35, Anhang 11.2.). In acht Fällen konnten jeweils Stämme mit gleichem Sero- und Sequenztypen in traditionellen Brunnen über Zeiträume von 14 bis 24 Wochen isoliert werden. Angaben zur Überlebensfähigkeit von Salmonellen in Wasser reichen von 30 Tagen (POKORNY 1988) bis zu 4 Monaten (CARLSON 2000). Über Zeiträume von 82 oder auch 24 Wochen, wie sie in Benin ermittelt wurden, ist bislang in der Literatur nicht berichtet worden. Es besteht die Möglichkeit, dass die Salmonellen nicht über die gesamte Zeitspanne hinweg im Wasser überlebt haben, sondern das Wasser durch die gleiche Kontaminationsquelle im Laufe der Wochen rekontaminiert wurde. Im Falle des Brunnens KAK-S könnte die Rekontamination auf einen menschlichen Ausscheider zurückzuführen sein, da ein Stamm (175 st.22 s1.1) des gleichen Sero- und Sequenztypen (S. Koketime, ST519) 2008 auch aus einer Stuhlprobe isoliert wurde. Mehrere Studien haben erwiesen, wie widerstandsfähig Salmonellen sind und wie gut sie unter den verschiedensten Umweltbedingungen überleben können. BLEASDALE *et al.* (2009) haben beispielsweise gezeigt, dass Salmonellen ein Typ III-Sekretionssystem nutzen, um in Amöben überleben zu können. Amöben, die auch in Wasser leben, könnten also eine bedeutende Quelle für Salmonellen in der Umwelt darstellen. *Salmonella* Typhimurium kann sogar in Pflanzenzellen eindringen und sich dort vermehren (SCHIKORA 2008).

4.3.2. Stuhl-Untersuchungen in dem Dorf Kaki Koka

Bei der von Oktober 2003 bis Januar 2004 in Kaki Koka durchgeführten Studie konnte in keinem Fall der Nachweis erbracht werden, dass sich die Dorfbewohner durch den Konsum Salmonellen-kontaminierter Wassers infiziert hatten. Selbst im Stuhl der Probanden, die regelmäßig das Wasser kontaminierter Brunnen getrunken hatten, konnten die wassergebundenen *Salmonella* Stämme nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen konnten folgende mögliche Schlüsse gezogen werden:

- Die Pathogenität der Serotypen, die aus Wasser isoliert wurden (*S. Johannesburg*, *S. Amoutive*, *S. Elisabethville*, *S. Koketime*, *S. Teshie* und *S. Nima*), war zu schwach ausgeprägt, um eine Infektion auslösen zu können bzw. die Zellen lagen in zu großer Verdünnung im Wasser vor, um die nötige Infektionsdosis zu erreichen.
- Die im Wasser vorkommenden Stämme stammten wahrscheinlich nicht aus Fäkal-Kontaminationen der untersuchten Dorfbewohner, sondern waren tierischen Ursprungs.
- Die Infektionen der Probanden, in deren Stühlen Salmonellen nachgewiesen werden konnten (*S. Cubana*, *S. Waycross*, *S. Sangera*, *S. Typhi*, *S. Offa*), stammten aus kontaminierter Nahrung und nicht aus dem Trinkwasser.

Die Diskrepanz der im Trinkwasser und in Stühlen auftretenden Salmonellen-Serotypenmuster wurde überprüft, indem die Studie 2008 in demselben Dorf wiederholt wurde (ZOBEL 2008, KRÖGER 2008). Da jeweils sämtliche aus einer Stuhl- bzw. Wasserprobe isolierten Salmonellenkolonien überprüft wurden, gelang der Nachweis, dass *Salmonella*-Stämme, die aus Wasserproben isoliert wurden, bei 6,5 % der untersuchten Probanden Infektionen auslösen konnten. Zusätzlich zur Serotypisierung durchgeführte MLST-Untersuchungen der aus Stuhlproben und den korrespondierenden Wasserquellen isolierten Stämme bestätigten in fünf Fällen, dass die Salmonellen-Infektion auf den aus Wasser isolierten Stamm zurückzuführen war (Tab. 20). Eine Feintypisierung der Stämme mittels PFGE wird derzeit am RKI in Wernigerode durchgeführt, um das Ergebnis zu bestätigen. Die Untersuchungen waren bei Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Die Keimträger der wassergebundenen Salmonellen gaben

an, in den vorangegangenen sechs Wochen wenigstens unter einem der drei Symptome Bauchschmerzen, Fieber und Durchfall gelitten zu haben (KRÖGER 2008, ZOBEL 2008). Die für manche Probanden nachgewiesene zeitgleiche Infektion mit zwei verschiedenen *Salmonella* Serovaren verdeutlicht, dass die Hygiene-Bedingungen, unter denen diese Menschen leben, als sehr unzureichend einzustufen sind.

4.3.3. *Salmonella* outer proteins (Sop)

Die bei der Untersuchung der Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA ermittelten Expressionsmuster der beninischen Salmonellen unterscheiden sich nicht von denen bislang untersuchter klinischer Stämme (STRECKEL *et al.* 2004, PRAGER *et al.* 2003). Es konnte kein charakteristisches Profil für diese Umweltisolate nachgewiesen werden. 66 % (Expressions-Typen 1, 2, 3, 10 und 11; Tab. 33) der untersuchten Stämme exprimieren sowohl SopB als auch SopD, was als typisches Expressionsmuster für enteritische Stämme gilt (STRECKEL *et al.* 2004, PRAGER *et al.* 2003, WALLIS und GALYOV 2000). SopB gilt allgemein als Marker für Pathogenität und die zusätzliche Expression von SopD kann als Zeichen dafür gesehen werden, dass die Infektion mit dem entsprechenden Stamm zu Durchfall führen kann. SopB ist eine Inositolphosphat-Phosphatase, die Phosphatidylinositol 3,4,5-P₃ (PtdIns(3,4,5)-P₃) hydrolysiert, den Botenstoff, der die Chloridsekretion inhibiert. Zusätzlich dephosphoryliert SopB gemeinsam mit SopD 1,3,4,5,6-Pentakisphosphat (InsP₅) zu Insositol 1,4,5,6-Tetrakisphosphat (InsP₄), was zur Folge hat, dass Phosphatidylinositol 3,4,5-P₃ (PtdIns(3,4,5)-P₃) vom Schließen der Chloridkanäle verdrängt wird. Dies hat eine erhöhte Chloridionen-Sekretion ins Darmlumen zur Folge, wodurch ein Flüssigkeitseinstrom induziert wird und somit wässrige Durchfälle entstehen (NORRIS *et al.* 1998, WALLIS und GALYOV 2000). Wird zusätzlich zu SopB und SopD auch SopE1 exprimiert – was dem Expressionstyp 2 entspricht, den 16 % der Stämme aufwiesen (Tab. 33) - so entsteht ein Expressionsmuster, das typischerweise für Stämme nachgewiesen werden konnte, die aus Patienten mit systemischen Erkrankungen isoliert wurden (STRECKEL *et al.* 2004, PRAGER *et al.* 2003,

WALLIS und GALYOV 2000). SopE1 spielt eine Rolle bei der Invasion der Bakterien in die Darmepithelzellen, indem es das *membrane ruffling* stimuliert (RAHMAN *et al.* 2004). Bei 21 % der untersuchten Stämme konnte *sopE1* auf DNA-Ebene mittels PCR nicht nachgewiesen werden (s. 3.4.1), da das Gen auf einem temperenten Phagen kodiert ist und somit nicht bei allen *Salmonella*-Stämmen vorliegt (RAHMAN *et al.* 2004, PRAGER *et al.* 2000). Der Nachweis des AvrA-Proteins fiel für 94 % der untersuchten Stämme negativ aus. Dies bedeutet allerdings nicht, dass die Stämme dieses Effektorprotein generell nicht exprimieren, denn wie Untersuchungen von BEN-BARAK *et al.* (2006) und STRECKEL *et al.* (2004) gezeigt haben, bleibt die Expression von AvrA häufig unter den unter 2.5.2 beschriebenen Anzucht-Bedingungen aus. Die Expression kann durch Absenkung des pH-Wertes im Anzucht-Medium auf unter pH 6 für viele der nicht-produzierenden Stämme induziert werden, was allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die beninischen *Salmonella*-Stämme nicht untersucht wurde. AvrA unterdrückt die inflammatorische Immunantwort und löst zelluläre Apoptose in menschlichen Epithelzellen aus, wodurch es wahrscheinlich den entzündlichen Weg einer Salmonellose verhindert (COLLIER-HYAMS *et al.* 2002).

4.3.4. Typisierung der Salmonellen mittels MLST

Für einige Methoden (Ribotyping, PFGE) werden Regionen des Genoms untersucht, die eine hohe Variabilität innerhalb einer Population aufweisen. Dieser Ansatz ist nützlich für eine Feintypisierung auf lokaler Ebene, aber nicht angebracht für eine globale Epidemiologie, die die Verwandtschaftsverhältnisse von Isolaten über eine größere zeitliche Periode und auf einer größeren geographischen Ebene betrachtet. Für das *Multilocus Sequence Typing* wurden daher *housekeeping* Gene ausgewählt, die für Proteine des Zentral-Metabolismus kodieren und keinem großen Selektionsdruck ausgesetzt sind. Daher können sie über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Isolaten verlässlichere Informationen liefern als Gene, die aufgrund eines Selektionsdrucks - ausgeübt durch Antibiotika oder das menschliche Immunsystem - hoch variabel sind (SPRATT 1999), wie beispielsweise Gene, die Proteine der äußeren Membran oder

Zelloberfläche kodieren (COOPER und FEIL 2004). Außerdem befinden sich die für MLST zu untersuchenden Gene an vielen verschiedenen Orten des Genoms, so dass sie nicht durch ein einziges genetisches Ereignis gemeinsam „vererbt“ werden können (URWIN und MAIDEN 2003) (Abb. 4). MLST hat dennoch eine große diskriminatorische Fähigkeit, da alle Nukleotid-Polymorphismen innerhalb der untersuchten Sequenz identifiziert werden können. Mit einigen Ausnahmen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) weisen die *housekeeping* Gene von den meisten Bakterien ausreichend genetische Variabilität auf, um mittels MLST eine große Vielzahl verschiedener Allele identifizieren zu können. Die Kombination dieser vielen unterschiedlichen Allele in den sieben Loci reicht aus, um Millionen verschiedener Sequenz-Typen unterscheiden zu können (FEIL und SPRATT 2001). Die Anzahl der zu analysierenden Gene kann zwar erhöht werden, um eine größere Selektivität zu erreichen, aber Untersuchungen haben gezeigt, dass ab einem bestimmten Punkt nur noch wenig zusätzliche Information hinzukommt, die in keinem Verhältnis zu dem zusätzlichen Zeit- und Kostenaufwand stehen (URWIN und MAIDEN 2003; MAIDEN 2006).

Für die selten vorkommenden beninischen Serotypen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass MLST gegenüber der klassischen Methode des Serotypisierens wichtige Vorteile bieten kann. Auch monophasische oder raue Varianten können mittels MLST typisiert und evolutionären Gruppen zugeordnet werden (Tab. 35 Anhang 11.2.). Außerdem haben wiederholte Serotypisierungen gezeigt, dass die Methode besonders für selten vorkommende Serotypen fehleranfällig ist (Tab. 12). Ein für die gesamte *S. enterica* MLST-Datenbank erstellter *Minimum spanning tree*, in dem die beninischen Stämme markiert dargestellt waren, hat gezeigt, dass sich die Isolate über das Spektrum aller bislang mit MLST untersuchter Stämme verteilen. Es gibt also keine Anhaltspunkte dafür, dass es sich bei den wasserassoziierten Umwelt-Salmonellen um eine eigene, minder infektiöse evolutionäre Gruppe handelt.

4.4. Ausblick

Isolierungen von Salmonellen aus klinischen Materialien finden in Benin heutzutage sehr selten und Serotypisierungen überhaupt nicht routinemäßig statt. Über die Verteilung von Umwelt-Salmonellen liegen außer den in dieser Arbeit ermittelten Analyseergebnissen keine Informationen vor. Die gewonnenen Daten sollen Nutzern verschiedener Institutionen in Benin, wie der Universität, der staatlichen Wasserbehörde, dem Gesundheitsministerium und dem nationalen WHO-Büro in Form des Informationssystems SalmEau, das zeitnah ins Französische übersetzt wird, zugänglich gemacht werden. Nach Abschluss des IMPETUS-Projektes im August 2009 wird das *Laboratoire d'Analyses des Eaux* in Parakou an die DG-Eau übergeben. Die Laborgeräte und –materialien werden übernommen und die beiden langjährigen IMPETUS-Mitarbeiter bleiben weiterhin beschäftigt, um gewährleisten zu können, dass auch zukünftig bakteriologische Trinkwasseruntersuchungen in Zentral-Benin durchgeführt werden. Sie verfügen über das Know-How und die technischen Möglichkeiten, die Analysen durchzuführen und Salmonellen zu identifizieren. SalmEau könnte die Datengrundlage zukünftiger Studien sein und vielleicht eines Tages dem Abgleich von Umwelt-Salmonellen mit klinischen Isolaten dienen. Da für die Bestimmung selten vorkommender Serotypen das Vorhalten einer großen Vielzahl verschiedener Antikörperseren notwendig ist, deren Herstellung und Qualitätskontrolle sehr kompliziert und zeitintensiv bzw. eine Anschaffung sehr kostenaufwendig ist, könnte sich MLST als die in Benin praktikablere Methode erweisen.

5. Zusammenfassung

Die Situation der Trinkwasserversorgung im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet in Benin, Westafrika, ist dadurch gekennzeichnet, dass viele Menschen keinen Zugang zu sicherem Trinkwasser haben. Am häufigsten stehen offene traditionelle und moderne Brunnen, die 90 % aller Wasserquellen ausmachen, zur Trinkwasserversorgung zur Verfügung. Bohrlöcher mit geschlossenen Pumpenanlagen, die bakteriologisch unbedenkliches Wasser liefern, machen nur 6 % aller Wasserstellen aus. Aufgrund unzureichender Trinkwasserhygiene und eines Mangels an grundlegenden sanitären Einrichtungen sind 70 % aller Wasserquellen mit dem Fäkalindikator *Escherichia coli* kontaminiert. Für diese Arbeit wurde *Salmonella enterica* neben *E. coli* als Indikatorkeim zur Einschätzung der Infektionsgefahr für die Wasserkonsumenten nachgewiesen. In 8 % der untersuchten Wasserstellen konnten Kontaminationen durch enteritische Salmonellen detektiert werden. In dem Wasser moderner Brunnen, die aufgrund ihrer baulichen Eigenschaften vor dem Eintrag von Kontaminationen in das Wasser geschützt sind als traditionelle Brunnen, konnte ebenfalls in 17 Fällen enteritische Salmonellen nachgewiesen werden. Die Stämme konnten vielen verschiedenen, selten vorkommenden Serotypen zugeordnet werden, von denen keiner vorherrschend in der Region vorkam. Insgesamt gehörten 177 *Salmonella*-Stämme zu 79 verschiedenen Serotypen. Ein bislang unbekannter Serotyp mit der Antigenformel $\langle 1, 42 : 1, w : z_{35} \rangle$ wurde als *S. Parakou* in das White-Kauffmann-Le Minor Schema übernommen. Untersuchungen der Stämme mittels *Multilocus Sequence Typing* (MLST) ergaben, dass es sich um eine Vielzahl bislang unbekannter Sequenztypen (ST) handelt, die in die *S. enterica* MLST-Datenbank eingefügt wurden. Zur Einschätzung des Infektionsrisikos für die Wasserkonsumenten wurden die als *Salmonella outer proteins* (Sop) bezeichneten Virulenz-assoziierten Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA auf DNA- und Protein-Ebene für die Umwelt-Isolate nachgewiesen. 66 % der Stämme zeigten ein Expressionsmuster, das dem entspricht, das typischerweise für klinische Enteritis-Isolate nachgewiesen wurde. Untersuchungen von Stuhlproben der

Einwohner eines Dorfes, in dem verschiedene Wasserstellen durch Salmonellen kontaminiert waren, haben ergeben, dass bei 6,5 % der Probanden der Sero – und Sequenztyp aus der Stuhlprobe mit dem der genutzten Wasserquelle übereinstimmte.

6. Summary

Inadequate access to safe drinking water supply is one of the most pressing issues in the upper Ouémé basin in central Benin, West Africa. Wells, both modern and traditional, account for 90 % of all water sources in the region and thus provide the most commonly utilised form of disposable water supply. In contrast, boreholes equipped with closed pump systems, which deliver bacteriologically harmless water, make up only 6 % of the registered water sources. Inadequate water hygiene and a lack of basic sanitation cause 70 % of all water sources being contaminated with faecal contamination through *Escherichia coli*. This study also detected *Salmonella enterica* as an additional indicator further increasing the risk of infection for water consumers. In total 8 % of all examined drinking water sources was contaminated by non-typhoid Salmonellae. Water from modern wells, even though their construction tends to protect water better against contamination than traditional wells, was still found to be contaminated by Salmonellae in 17 cases. The isolates belonged to many different and rarely known serotypes of which none was predominant. Altogether 177 *Salmonella* strains belonged to 79 different serotypes. One hitherto unknown serotype with the antigenic formula $\langle 1, 42 : 1, w : z_{35} \rangle$ was enregistered as *S. Parakou* to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Genotyping the strains with multilocus sequence typing (MLST) revealed a large number of new Sequence Types (ST) which were submitted to the *S. enterica* MLST-database. In order to estimate the hazard risk for water consumers, this study investigated the virulence-associated effector proteins called *Salmonella outer proteins* (Sop) SopB, SopD, SopE1, SopE2 and AvrA on DNA- and protein level. 66 % of the environmental strains displayed an expression profile which is typically for clinical enteric pathovars. Examinations of human stool samples in a village where several water sources had been contaminated by enteric Salmonellae revealed that 6.5 % of the examined inhabitants carried the same serotype in their stool as detected in the water source used by the proband.

7. Résumé

La faible accessibilité à une eau potable salubre par un nombre important d'habitants est une caractéristique fondamentale de la situation d'approvisionnement en eau potable dans la Haute Vallée de l'Ouémé. Les puits modernes et traditionnels sont les sources d'eau le plus fréquemment utilisés pour l'approvisionnement en eau. Ils constituent 90 % de toutes les sources d'eau dans la région tandis que les forages munis de pompes et qui fournissent une eau d'une bonne qualité bactériologique ne représentent que 5 % des sources d'eau enregistrées. En raison du manque d'hygiène suffisante de l'eau potable et un assainissement de base, 70 % de toutes les sources d'eau sont contaminées par la bactérie *Escherichia coli*, indicateur des contaminations fécales. Ce travail a pour but d'estimer le risque auquel sont confrontés des consommateurs d'eau contaminée en décelant *Salmonella enterica* comme indicateur supplémentaire. De toutes les sources d'eau de consommation examinées, 8 % sont contaminées par des *Salmonelles* entériques. Bien que l'eau des puits modernes soit, en vertu des propriétés architecturales, mieux protégée contre l'entrée des contaminations que l'eau des puits traditionnels, 17 puits modernes ont été contaminés par des *Salmonelles*. Les souches détectées appartiennent à beaucoup de différents sérotypes, rarement connu. Au total 177 différentes souches présentent 79 différents sérotypes. Un nouveau sérotype avec la formule antigénique $< \underline{1}, 42 : I, w : z_{35} >$ a été enregistré dans le schéma White-Kauffmann-Le Minor comme *S. Parakou*. Un typage des *Salmonelles* par *multilocus sequence typing* (MLST) a donné un grand nombre de nouvelles séquences type (ST), qui sont introduites dans la base de données *S. enterica*-MLST. Pour une estimation du risque d'infection des consommateurs d'eau contaminée, des *Salmonella outer proteins* (Sop) SopB, SopD, SopE1, SopE2 et AvrA ont été décelés au niveau d'ADN et comme protéines. 66 % des souches investiguées ont montré un profil d'expression de ces protéines effectrices liées à la virulence, qui ressemble au profile typique pour des souches cliniques isolées dans le contexte des entériques. Une investigation des échantillons de selle dans un village, où plusieurs sources d'eau étaient contaminées par des *Salmonelles*, a décelé

que pour 6,5 % des selles analysées, le sérotype correspond au sérotype qui a été isolé d'eau de la source que l'habitant a consommée.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Administrative Karte von Benin	3
Abbildung 2: Im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet zur Verfügung stehende Trinkwasserquellen	6
Abbildung 3: Situation der Trinkwasserversorgung im oberen Ouémé Einzugsgebiet in Zentral-Benin	7
Abbildung 4: Lokalisierung der für MLST untersuchten Gene im <i>Salmonella</i> -Genom.	17
Abbildung 5: Beispiel eines <i>Minimum spanning trees</i> in BioNumerics.	18
Abbildung 6: a) Wasserentnahme aus einem Tonkrug zur Wasserlagerung (<i>Jarre</i>) mit einer sterilen Duran Flasche. b) Farouk Mazou flammt vor Entnahme der Wasserprobe den Hahn einer Pumpe ab.....	26
Abbildung 7: <i>Salmonella</i> -Kolonien auf XLD-Agar.....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der MLST-Methode nach FEIL <i>et al.</i> (2001)	30
Abbildung 9: Beispiele für Latrinen, zu denen im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet nur wenige Menschen Zugang haben .	42
Abbildung 10: Beispiele für zwei von insgesamt 17 modernen Brunnen, aus deren Wasser enteritische Salmonellen isoliert wurden....	44
Abbildung 11: Eintrag des neu entdeckten Serotypen <i>Salmonella</i> Parakou in die 9. Edition des White-Kauffmann-Le Minor Schemas.....	46
Abbildung 12: Wasserloch in dem Dorf Yatanifaga, aus dem 2003 <i>Salmonella</i> Parakou isoliert werden konnte	46
Abbildung 13: Agarosegel mit den aufgetrennten PCR-Produkten der untersuchten <i>housekeeping</i> -Gene <i>thrA</i> (852 bp), <i>aroC</i> (826 bp), <i>sucA</i> (643 bp), <i>purE</i> (510 bp), <i>dnaN</i> (833 bp), <i>hisD</i> (894 bp), <i>hemD</i> (666 bp).....	56
Abbildung 14: Eintrag der Allel-Nummern und der Stamm-Informationen in die <i>S.enterica</i> -MLST Datenbank	58

Abbildung 15: Populationsmodell von 165 beninischen <i>Salmonella</i> - Stämmen im <i>Minimum Spanning Tree</i> basierend auf den Allel-Profilen, die mittels MLST ermittelt wurden.....	64
Abbildung 16: Semi-quantitativer Expressions-Nachweis der Virulenz- Faktoren SopB und SopD mittels Western Blot.	73
Abbildung 17: Graphische Darstellung der durch Salmonellen kontaminierten Brunnen im Untersuchungsgebiet in dem Informationssystem SalmEau.	76
Abbildung 18: Mangelnde Trinkwasserhygiene.....	80

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesundheitsindikatoren für Benin für das Jahr 2004	1
Tabelle 2: Einteilung der Gattung <i>Salmonella</i> in Spezies und Subspezies	9
Tabelle 3: Literaturangaben zur Infektionsdosis von enteritischen und typhösen Salmonellen	12
Tabelle 4: Die Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA, die durch das <i>Salmonella</i> SP-1 T3SS transloziert werden und ihre Funktion im Infektionsprozess	22
Tabelle 5: Für die MLST-Analyse verwendete Primer.	31
Tabelle 6: Für den Nachweis der Pathogenitätsfaktoren <i>sopB</i> , <i>sopD</i> , <i>sopE1</i> und <i>avrA</i> auf DNA-Ebene verwendete Primer-Paare.	35
Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele für die Western-Blot-Analyse.....	36
Tabelle 8: Die für den Nachweis der Effektorproteine mittels Western Blot eingesetzten Antikörper.....	38
Tabelle 9: Die verschiedenen Arten der Trinkwasserversorgung im ländlichen oberen Ouémé Einzugsgebiet und deren prozentuale Verteilung in den Jahren 2001, 2005 und 2008.....	41
Tabelle 10: Im Beprobungsgebiet Bassila-Parakou-Djougou seit 2002 aus Wasserproben isolierte <i>Salmonella</i> -Serotypen, die für die vorliegende Arbeit untersucht wurden; alphabetisch nach Dörfern sortiert.	47
Tabelle 11: Aus Stuhlproben der Dorfbewohner von Kaki Koka isolierte Salmonellen, die im Rahmen dieser Arbeit mit MLST untersucht wurden.....	51
Tabelle 12: Ergebnisse wiederholter Serotypisierungen für einige ausgewählte Stämme.....	52
Tabelle 13: Serotypen, die häufiger als zweimal aus Wasserquellen des oberen Ouémé Einzugsgebietes isoliert werden konnten.	53
Tabelle 14: Isolierung von Stämmen des gleichen Sero- und Sequenztypen aus einer Wasserstelle mit zeitlichem Abstand...	54

Tabelle 15: Empfindlichkeitsbestimmung der beninischen Isolate gegenüber verschiedener Antibiotika.	55
Tabelle 16: Die für 165 untersuchte Stämme ermittelten Allele der sieben <i>housekeeping</i> Gen-Abschnitte	57
Tabelle 17: Ermittelte Kombination von Allen und den sich daraus ergebenden Sequenztypen der untersuchten Salmonellen.	58
Tabelle 18: Serotypen, die sich in mehrere STs unterteilen.	60
Tabelle 19: Sequenztypen, zu denen verschiedene Serotypen gehören.	61
Tabelle 20: Vergleich von <i>Salmonella</i> Sequenztypen, die in dem Dorf Kaki Koka aus Stuhlproben und den korrespondierenden (vom Probanden genutzten) Wasserquellen isoliert wurden (ZOBEL 2008, KRÖGER 2008).	62
Tabelle 21: <i>eBurstGroup</i> 9	65
Tabelle 22: <i>eBurstGroup</i> 13	66
Tabelle 23: <i>eBurstGroup</i> 16	66
Tabelle 24: <i>eBurstGroup</i> 24	67
Tabelle 25: <i>eBurstGroup</i> 36	67
Tabelle 26: <i>eBurstGroup</i> 38	67
Tabelle 27: <i>eBurstGroup</i> 49	68
Tabelle 28: <i>eBurstGroup</i> 53	68
Tabelle 29: <i>eBurstGroup</i> 67	68
Tabelle 30: <i>eBurstGroup</i> 77	69
Tabelle 31: provisorische Gruppe 87.....	69
Tabelle 32: <i>eBurstGroup</i> 94	69
Tabelle 33: Ergebnisse der Expressions-Untersuchungen der Virulenz-assoziierten Effektorproteine SopB, SopD, SopE1, SopE2 und AvrA.	73
Tabelle 34: Vergleich der Expressionsmuster der 2003/2004 in Kaki Koka aus Wasser und aus Stuhl isolierten <i>Salmonella</i> -Stämme	75
Tabelle 35: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte <i>Salmonella</i> Stämme und Analyseergebnisse, alphabetisch nach Serotypen sortiert.	115

10. Literaturverzeichnis

- AANENSEN, D. M. und B. G. SPRATT, 2005 The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 33: W728-733.
- ACHTMAN, M., T. AZUMA, D. E. BERG, Y. ITO, G. MORELLI *et al.*, 1999 Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol* 32: 459-470.
- ANJUM, M. F., C. MAROONEY, M. FOOKES, S. BAKER, G. DOUGAN *et al.*, 2005 Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun* 73: 7894-7905.
- APPLIED MATHS NV, BELGIEN, 2008 BioNumerics® Manual Version 5.1.
- BAKOWSKI, M. A., J. T. CIRULIS, N. F. BROWN, B. B. FINLAY und J. H. BRUMELL, 2007 SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* 9: 2839-2855.
- BAUDART, J., K. LEMARCHAND, A. BRISABOIS und P. LEBARON, 2000 Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl Environ Microbiol* 66: 1544-1552.
- BEN-BARAK, Z., W. STRECKEL, S. YARON, S. COHEN, R. PRAGER *et al.*, 2006 The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory function. *Int J Med Microbiol* 296: 25-38.
- BITSORI, M., E. GALANAKIS, S. MARAKI, M. RAISSAKI, E. VELIVASSAKIS *et al.*, 2001 Invasive *Salmonella virchow* infection in childhood. *Scand J Infect Dis* 33: 862-865.
- BLEASDALE, B., P. J. LOTT, A. JAGANNATHAN, M. P. STEVENS, R. J. BIRTLES *et al.*, 2009 The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 75: 1793-1795.
- BOCKEMÜHL, J., 1992 Gattung *Salmonella*. *Mikrobiologische Diagnostik*, Burkhardt F. (Hrsg.). Georg Thieme Verlag: 138-141.
- BORLAND, E. D., 1975a *Salmonella* infection in dogs, cats, tortoises and terrapins. *Vet Rec* 96: 401-402.
- BORLAND, E. D., 1975b *Salmonella* infection in poultry. *Vet Rec* 97: 406-408.
- BOSSOU, D. B., 2001 Analyse et esquisse cartographique de la contamination bactériologique de la nappe phréatique alimentant les puits traditionnels de la ville de Cotonou et sa banlieue. Mémoire de DESS-MEQUE. FAST/UAS.: 82p + Annexes.

- BROWN, E. W., M. K. MAMMEL, J. E. LECLERC und T. A. CEBULA, 2003 Limited boundaries for extensive horizontal gene transfer among *Salmonella* pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 15676-15681.
- BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ, 2001 Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001).
- CARLSON, S., 2000 Mikrobiologie des Wassers. Wasser, Höll, K. (Hrsg.): .
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2003 Reptile-associated salmonellosis--selected states, 1998-2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 12: 1206-1209.
- CHRISTOPH, M. C., FINK A., DIEKKRÜGER B., GIERTZ, S., REICHERT, B., SPETH, P., 2008 IMPETUS: Implementing HELP in the Upper Ouémé basin. Water SA 34.
- COLLIER-HYAMS, L. S., H. ZENG, J. SUN, A. D. TOMLINSON, Z. Q. BAO *et al.*, 2002 Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. J Immunol 169: 2846-2850.
- COOPER, J. E. und E. J. FEIL, 2004 Multilocus sequence typing-what is resolved? Trends Microbiol 12: 373-377.
- COTTER, P. A. und V. J. DIRITA, 2000 Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu Rev Microbiol 54: 519-565.
- DARWIN, K. H. und V. L. MILLER, 1999 Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. Clin Microbiol Rev 12: 405-428.
- DEGBEY, C., M. MAKOUTODE, E.-M. OUENDO, B. FAYOMI, C. DE BROUWER, 2008 La qualité de l'eau de puits dans la commune d'Abomey-Calavi au Bénin (The quality of well water in the municipality of Abomey-Calavi in Benin). Environnement risques & santé ISSN 1635-0421 7: 279-283.
- DIONISIO, L. P. C., JOAO, M., FERREIRO, V.S., FIDALGO, M.L., GARCIA, M.E., BORREGO, R., BORREGO, J.J., 2000 Occurrence of *Salmonella* spp in estuarine and coastal waters of Portugal. Antonie van Leeuwenhoek 78: 99-106.
- ENRIGHT, M. C., und B. G. SPRATT, 1999 Multilocus sequence typing. Trends Microbiol 7: 482-487.
- ERREN, T., A. PINGER, C. PIEKARSKI, 2003 Trinkwasserchlorung - Nutzen und mögliche Risiken. Rheinisches Ärzteblatt 10.
- FALUSH, D., M. TORPDAHL, X. DIDELOT, D. F. CONRAD, D. J. WILSON *et al.*, 2006 Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model and data. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361: 2045-2053.

- FEIL, E. J., E. C. HOLMES, D. E. BESSEN, M. S. CHAN, N. P. DAY *et al.*, 2001 Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 182-187.
- FEIL, E. J., und B. G. SPRATT, 2001 Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 55: 561-590.
- FOLAL, H. F., und G. M. GONOU, 2002 La pollution des eaux liée à l'évacuation des excréta en milieu lacustre: Cas du village de Ganvié sur le lac Nokoué/Bénin. Mémoire de DIT. APE/CPU/UAC.: 86 p. + Annexes.
- FRASER, C., W. P. HANAGE und B. G. SPRATT, 2005 Neutral microepidemic evolution of bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1968-1973.
- FROST, A. J., A. P. BLAND und T. S. WALLIS, 1997 The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 34: 369-386.
- GALAN, J. E., 2001 *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 53-86.
- GALYOV, E. E., M. W. WOOD, R. ROSQVIST, P. B. MULLAN, P. R. WATSON *et al.*, 1997 A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 25: 903-912.
- GOGARTEN, J. P., W. F. DOOLITTLE und J. G. LAWRENCE, 2002 Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* 19: 2226-2238.
- GREENBERG, A. E. und H.J. Ongerth, 1966 Salmonellosis in Riverside, Calif. *J. Am. Water Works Assoc.* 58: 1145-1150.
- GRIMONT, P. A. D. und Weill, F.-X., 2007 Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
- GROHMANN, A., U. HÄSSELBACH, W. SCHWERDTFEGGER, 2003 Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001. Die Trinkwasserverordnung, Einführung und Erläuterungen für Wasserversorgungsunternehmen und Überwachungsbehörden. 4. Auflage, Erich Schmidt Verlag.
- GROISMAN, E. A., und H. OCHMAN, 1997 How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5: 343-349.
- GUGNANI, H. C., J. U. OGUIKE und R. SAKAZAKI, 1986 Salmonellae and other enteropathogenic bacteria in the intestines of wall geckos in Nigeria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 52: 117-120.

- GUNDRY, S. W., J.A. WRIGHT, R. CONROY, DU PREEZ, M.B. GENTHE, S. MOYO, C. MUTISI, J. NDAMBA, N. POTGIETER, 2006 Contamination of drinking water between source and point-of-use in rural households of South Africa and Zimbabwe: implication for monitoring the Millenium Development Goal for water. *Water Practice & Technol* 1 (2): 1-9
- HARBOTTLE, H., D. G. WHITE, P. F. McDERMOTT, R. D. WALKER und S. ZHAO, 2006 Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella* enterica serotype Newport isolates. *J Clin Microbiol* 44: 2449-2457.
- HARTUNG, M., 2002 Ergebnisse der Zoonosenerhebung 2001 bei Lebensmitteln. 55. Arbeitstagung des Arbeitskreises lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger (ALTS), Berlin, 18.-20.6.2002, Ergebnisprotokoll 67-78.
- HELDMANN, M., 2008a Ethnic groups in Benin. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- HELDMANN, M. und M. DOEVENSPECK, 2008b Demography: Spatial Disparities and High Growth Rates. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- HELDMANN, M., V. MULINDABIGWI, T. BREUER, 2008c Benin - Socio-Economic Background. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- HENSEL, M., 2004 Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella* enterica. *Int J Med Microbiol* 294: 95-102.
- HERIKSTAD, H., Y. MOTARJEMI und R. V. TAUXE, 2002 *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect* 129: 1-8.
- HOF, H., 2000 Spezielle Bakteriologie – *Salmonella*. Medizinische Mikrobiologie, 2. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag.
- HUNTER, P. R., 1997 Typhoid and Paratyphoid Fevers and Other *Salmonella* Infections. *Waterborne Disease, Epidemiology and Ecology*; John Wiley & Sons Verlag.
- INSAE (INSTITUT NATIONAL DE LA STATISTIQUE ET DE L'ANALYSE ÉCONOMIQUE), 2004 Troisième Recensement Général de la Population et de l'Habitation.
- JANSEN, A., C. FRANK, R. PRAGER, H. OPPERMAN und K. STARK, 2005 Nation-wide outbreak of *Salmonella* Give in Germany, 2004. *Z Gastroenterol* 43: 707-713.

- KAYSER, F. H., K. A. BIENZ, J. ECKERT, R. M. ZINKERNAGEL, 2001 Bakterien als Krankheitserreger - *Salmonella*. Medizinische Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag 10.Auflage: 293-298.
- KIDGELL, C., U. REICHARD, J. WAIN, B. LINZ, M. TORPDAHL *et al.*, 2002 *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* 2: 39-45.
- KLEER, J., 2003 *Salmonella*. Einführung in die Lebensmittelhygiene, Sinell, H.-J.(Hrsg.), Parey-Verlag, Stuttgart: 19-33
- KLEIN, T., 2005 Befindensweisen & therapeutische Wege in Dendougou, Benin. Dissertation, Institut für Völkerkunde, Universität zu Köln.
- KOCH, J., K. ALPERS, A. AMMON, 2001 Infektionen mit Salmonellen beim Menschen. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 2001; BgVV-Heft 6/2002, herausgegeben von M. Hartung.
- KÖHLER, W., H. J. EGGERS, , B. FLEISCHER, R. MARRE, H. PFISTER, G. PULVERER, 2001 Die Gattung *Salmonella*. Medizinische Mikrobiologie, Urban & Fischer Verlag 8. Auflage.
- KOHLMANN, F., 2008 Prävalenz, Transkription, Translation und Polymorphismus von Virulenz- assoziierten Effektorproteinen - Beitrag zu einer Virulenzmuster- Analyse für epidemiologische und klinische Zwecke. Diplomarbeit angefertigt am Robert Koch Institut, Bereich Wernigerode, Abteilung für Infektionskrankheiten.
- KOPLAN J. P., R. D. DEEN, W. H. SWANSTON, B. TOTA, 1978 Contaminated Roof-Collected Rainwater as a Possible Cause of an Outbreak of Salmonellosis. *Journal of Hygiene Cambridge* 81 (2): 303-309.
- KOTETISHVILI, M., O. C. STINE, A. KREGER, J. G. MORRIS, JR. und A. SULAKVELIDZE, 2002 Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *salmonella* strains. *J Clin Microbiol* 40: 1626-1635.
- KOUTSOTOLI, A. D., M. E. PAPASSAVA, V. E. MAIPA und Y. P. ALAMANOS, 2006 Comparing *Shigella* waterborne outbreaks in four different areas in Greece: common features and differences. *Epidemiol Infect* 134: 157-162.
- KRÖGER, B., 2008 Untersuchungen zur Frage der Aquisition von Salmonellen durch Konsum kontaminierten Trinkwassers - Vergleich der Salmonellenserovare in Trinkwasser- und Stuhlproben von Konsumenten in einem westafrikanischen Dorf. Unveröffentlichte Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
- KRÜGER, S. A., M. JUDEX und H.-P. THAMM, 2009 Erstellung von Multimedia-Atlanten mit dem Geopublisher. FOSSGIS Konferenz 2009, Hannover, 17.-19. März 2009.

- LAGNIKA, M., 2008 Les déterminants du risque de contamination bactériologique des eaux des forages dans les ménages de la Haute Vallée de l'Ouémé: cas du triangle Parakou-Djougou-Bassila. Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées en Management Environnemental et Qualité des Eaux, Département de Chimie-Faculté des Sciences et Techniques-Université d'Abomey-Calavi.
- LE MINOR, L. und M. Y. POPOFF, 1987 Request for 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.
- LINDQUIST, J., 1998 *Salmonella* – General Aspects and Nomenclature. Laboratory Manual for the Food Microbiology Laboratory.
- LOHNER, N., 2003 Trinkwasserkonsum und Infektionsrisiko durch bakterielle Erreger am Beispiel der Ouémé-Region in Benin/Westafrika. Diplomarbeit, Landwirtschaftliche Fakultät der Universität zu Bonn.
- MAGGY, M., N. B. MOMBA, P. KALENI, 2002 Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. Water Research 36: 3023-3028.
- MAIDEN, M. C., 2006 Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol 60: 561-588.
- MAIDEN, M. C., J. A. BYGRAVES, E. FEIL, G. MORELLI, J. E. RUSSELL *et al.*, 1998 Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3140-3145.
- MAKOUTODE, M., A. K. ASSANI, E.-M. OUENDO, V.D. AGUEH, P. DIALLO, 1999 Qualité et mode de gestion de l'eau de puits en milieu rural au Bénin: cas de la sous-préfecture de Grand-Popo. Médecine d'Afrique Noire 46: 528-534.
- MALORNY, B., E. JUNKER und R. HELMUTH, 2008 Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. BMC Microbiol 8: 84.
- MARA, D., 2003 Faecal indicator organisms. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology: 105-113.
- MARYLAND DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE, 2006 Laboratory statistics. Critical link 10.
- MASTROENI, P. und D. MASKELL, 2006 *Salmonella* infections. Clinical, Immunological and Molecular Aspects. Advances in Molecular and Cellular Microbiology 9, Cambridge University Press.
- MAZOU, F., A. UESBECK, R. BAGINSKI, 2008 Drinking water supply in the Upper Ouémé Catchment. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas

- Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- MCDONALD, T. A., und H. KOMULAINEN, 2005 Carcinogenicity of the chlorination disinfection by-product MX. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 23: 163-214.
- MINTZ, E., J. BARTRAM, P. LOCHERY und M. WEGELIN, 2001 Not just a drop in the bucket: expanding access to point-of-use water treatment systems. *Am J Public Health* 91: 1565-1570.
- MOCHMANN, H., W. KÖHLER, 1997 Die Entdeckung der Enteritissalmonellen und der Erreger des Paratyphus. Meilensteine der Bakteriologie.
- MOE, C. L., M. D. SOBSEY, G. P. SAMSA und V. MESOLO, 1991 Bacterial indicators of risk of diarrhoeal disease from drinking-water in the Philippines. *Bull World Health Organ* 69: 305-317.
- MOLINERO, M. E., I. FERNANDEZ, M. A. GARCIA-CALABUIG und E. PEIRO, 1998 Investigation of a water-borne *Salmonella* ohio outbreak. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 16: 230-232.
- MULINDABIGWI, M., S. GIERTZ, K. HADJER, M. HELDMANN, M. JUDEX, 2008 The Upper Ouémé Catchment. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- MÜLLER, H. E. UND D.A.A. MOSSEL, 1982 Observations on the occurrence of *Salmonella* in 20 000 samples of drinking water and a note on the choice of marker organisms for monitoring water supplies. *Antonie van Leeuwenhoek* 48: 641-644.
- MURAKAMI, K., K. HORIKAWA, T. ITO und K. OTSUKI, 2001 Environmental survey of *salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiol Infect* 126: 159-171.
- NAIR, S., J. WAIN, M. ACHTMAN, *et. al.* 2009 unveröffentlichte Daten, Molecular characterisation of host adapted *Salmonella enterica* serovar Paratyphi C-Choleraesuis group reveals evolutionary relationships.
- UNITED NATIONS, 2001 Millennium Development Goals. <http://www.un.org/millenniumgoals/>.
- NORRIS, F. A., M. P. WILSON, T. S. WALLIS, E. E. GALYOV und P. W. MAJERUS, 1998 SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14057-14059.
- OBOEGBULEM, S. I., und A. U. ISEGHOHIMHEN, 1985 Wall Geckos (Geckonidae) as reservoirs of Salmonellae in Nigeria: problems for epidemiology and public health. *Int J Zoonoses* 12: 228-232.

- OCHMAN, H., J. G. LAWRENCE und E. A. GROISMAN, 2000 Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405: 299-304.
- OCTAVIA, S. und R. LAN, 2006 Frequent recombination and low level of clonality within *Salmonella enterica* subspecies I. *Microbiology* 152: 1099-1108.
- OHL, M. E. und S. I. MILLER, 2001 *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52: 259-274.
- PARKHILL, J., G. DOUGAN, K. D. JAMES, N. R. THOMSON, D. PICKARD *et al.*, 2001 Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848-852.
- POKORNY, J., 1988 Survival and virulence of salmonellae in water. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 32: 361-366.
- POLO, F., M. J. FIGUERAS, I. INZA, J. SALA, J. M. FLEISHER *et al.*, 1999 Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75: 285-292.
- PRAGER, R., S. MIROLD, E. TIETZE, U. STRUTZ, B. KNUPPEL *et al.*, 2000 Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 290: 605-617.
- PRAGER, R., W. RABSCH, W. STRECKEL, W. VOIGT, E. TIETZE *et al.*, 2003 Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. *J Clin Microbiol* 41: 4270-4278.
- PROJET HYGIENE, ASSAINISSEMENT DE BASE ET EAU POTABLE (PHABEP), 2008 Stratégie du PHABEP pour améliorer l'accès à l'eau potable à Malanville, Rapport final.
- QUICK, R. E., A. KIMURA, A. THEVOS, M. TEMBO, I. SHAMPUTA *et al.*, 2002 Diarrhea prevention through household-level water disinfection and safe storage in Zambia. *Am J Trop Med Hyg* 66: 584-589.
- RAHMAN, H., W. STRECKEL, R. PRAGER und H. TSCHÄPE, 2004 Presence of *sopE* gene & its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* isolated from man & animals. *Indian J Med Res* 120: 35-38.
- RAM, P. K., A. NAHEED, W. A. BROOKS, M. A. HOSSAIN, E. D. MINTZ *et al.*, 2007 Risk factors for typhoid fever in a slum in Dhaka, Bangladesh. *Epidemiol Infect* 135: 458-465.
- REEVES, M. W., EVINS, G.M., HEIBA, A.A., PLIKAYTIS, B.D., FRAMER, J.J., 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: 313-320.

- RKI (ROBERT KOCH INSTITUT), 2002 *Salmonella* Oranienburg in Schokolade: Internationaler Ausbruch von Oktober bis Dezember 2001. Epidemiologisches Bulletin Nr. 3
- ROUMAGNAC, P., F. X. WEILL, C. DOLECEK, S. BAKER, S. BRISSE *et al.*, 2006 Evolutionary history of *Salmonella typhi*. *Science* 314: 1301-1304.
- RUIZ, M., J. C. RODRIGUEZ, E. SIRVENT, I. ESCRIBANO, L. CEBRIAN *et al.*, 2003 Usefulness of different techniques in the study of the epidemiology of salmonellosis. *APMIS* 111: 848-856.
- SAUTER, A., 2006 Bakteriologische Trinkwasseranalysen im ländlichen Raum des Oberen Ouémé Beckens, Benin, Westafrika. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
- SCHAREK, L. und K. TEDIN, 2007 The porcine immune system--differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by *Salmonella* serovars. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120: 347-354.
- SCHIKORA A., C., A., CHARPENTIER, E., HIRT, H., 2008 The Dark Side of the Salad: *Salmonella typhimurium* Overcomes the Innate Immune Response of *Arabidopsis thaliana* and Shows an Endopathogenic Lifestyle. *PLoS ONE* 3: 1 - 9.
- SCHLEGEL, H. G., 1992 Die Gruppen von Prokaryoten. Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- SCHLUMBERGER, M. C. und W. D. HARDT, 2006 *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol* 9: 46-54.
- SPRATT, B. G., 1999 Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* 2: 312-316.
- STANTON, B., R. BLACK, P. ENGLE und G. PELTO, 1992 Theory-driven behavioral intervention research for the control of diarrheal diseases. *Soc Sci Med* 35: 1405-1420.
- STRECKEL, W., A. C. WOLFF, R. PRAGER, E. TIETZE und H. TSCHÄPE, 2004 Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Mol Nutr Food Res* 48: 496-503.
- SUKHNANAND, S., S. ALCANE, L. D. WARNICK, W. L. SU, J. HOF *et al.*, 2005 DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J Clin Microbiol* 43: 3688-3698.
- TAYLOR, R., D. SLOAN, T. COOPER, B. MORTON und I. HUNTER, 2000 A waterborne outbreak of *Salmonella Saintpaul*. *Commun Dis Intell* 24: 336-340.

- THOMPSON, T., M. SOBSEY und J. BARTRAM, 2003 Providing clean water, keeping water clean: an integrated approach. *Int J Environ Health Res* 13 Suppl 1: S89-94.
- THONG, K. L., S. D. PUTHUCHEARY und T. PANG, 1997 Genome size variation among recent human isolates of *Salmonella typhi*. *Res Microbiol* 148: 229-235.
- TINDALL, B. J., P. A. GRIMONT, G. M. GARRITY und J. P. EUZEBY, 2005 Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 521-524.
- TORPDAHL, M., M. N. SKOV, D. SANDVANG und D. L. BAGGESEN, 2005 Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J Microbiol Methods* 63: 173-184.
- UESBECK, A., R. BAGINSKI, F. MAZOU, 2008 Bacteriologic Analysis of Drinking Water Sources in the Upper Ouémé Catchment. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.
- URWIN, R., und M. C. MAIDEN, 2003 Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 11: 479-487.
- VAN KESSEL, J. S., J. S. KARNS, D. R. WOLFGANG, E. HOVINGH, B. M. JAYARAO *et al.*, 2008 Environmental sampling to predict fecal prevalence of *Salmonella* in an intensively monitored dairy herd. *J Food Prot* 71: 1967-1973.
- VERHEYEN, J., M. TIMMEN-WEGO, R. LAUDIEN, I. BOUSSAAD, S. SEN, A. KOC, A. UESBECK, F. MAZOU, H. PFISTER 2009 Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl Environ Microbiol*.
- WALLIS, T. S. und E. E. GALYOV, 2000 Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* 36: 997-1005.
- WARD, L., 2000 Fatal neonatal *Salmonella rubislaw* infection in household with pet reptile in England. *Eurosurveillance* 4.
- WHO--WORK PROGRAMME, 2004 *Guidelines for drinking-water quality*. WHO, Geneva.
- WHO, 1997 *Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 3, Surveillance and control of community supplies. Vol. 3, Vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2006 Country Health System Fact Sheet Benin.
- WHO, 2008a Cholera. Fact sheet No.107.

- WHO, 2008b Weekly emergency situation update.
http://www.who.int/hac/crises/afro_weekly_15sept2008.pdf.
- WHO, GLOBAL TASK FORCE ON CHOLERA CONTROL, 2007 Cholera country profile: Benin.
<http://www.who.int/cholera/countries/Benin%20Country%20Profile%202007.pdf>.
- WHO/UNICEF JOINT MONITORING PROGRAMME FOR WATER SUPPLY AND SANITATION., 2000 Global water supply and sanitation assessment 2000 report. World Health Organization, Geneva.
- WICHELHAUS, T. A., V. SCHÄFER, V. BRADE, 2000 Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. Chemotherapie Journal Heft 2.
- WOLF, A. C., 2004 Herstellung, Reinigung und Antikörper- gestützter Nachweis der Virulenz- assoziierten Inositol- 4- Phosphatase SopB von *S. enterica*. Diplomarbeit, FH Anhalt, Abteilung Bernburg.
- WOODWARD, D. L., R. KHAKHRIA und W. M. JOHNSON, 1997 Human salmonellosis associated with exotic pets. J Clin Microbiol 35: 2786-2790.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008 Weekly Epidemiological Record = Relevé Epidémiologique Hebdomadaire, pp. World Health Organization., Geneva.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WATER SANITATION AND HEALTH TEAM., 2006 Guidelines for drinking-water quality incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations, pp. 494 p. World Health Organization, Geneva.
- WRIGHT, J., S. GUNDRY und R. CONROY, 2004 Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use. Trop Med Int Health 9: 106-117.
- YODER, J., V. ROBERTS, G. F. CRAUN, V. HILL, L. A. HICKS *et al.*, 2008 Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2005-2006. MMWR Surveill Summ 57: 39-62.
- ZHANG, S., R. A. KINGSLEY, R. L. SANTOS, H. ANDREWS-POLYMENIS, M. RAFFATELLU *et al.*, 2003 Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. Infect Immun 71: 1-12.
- ZOBEL, N., 2008 Untersuchung zum Auftreten hemmstoffbildender Bakterien in der Darmflora der Bewohner von Kaki Koka (Benin/Westafrika) gegen Salmonellen aus Trinkwasser. Unveröffentlichte Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln

11. Anhang

11.1. Fragebogen für Wasserkonsumenten

Personnes interrogées*

- 1=chef du village
- 2=Comité de gestion des points d'eau
- 3=Agent de santé
- 4=Groupement des femmes
- 5=Instituteur
- 6=Villageois

A) Comment qualifieriez-vous la situation en eau dans votre village?

- 1=très bonne
- 2=bonne
- 3=assez bonne
- 4=mauvaise

B) Estimez-vous disposer d'un nombre satisfaisant de point d'eau dans tout le village?

- 1=oui
- 2=non

C) Estimez-vous disposer d'un nombre satisfaisant de pompes dans tout le village?

- 1=oui
- 2=non

D) Connaissez-vous la démarche à suivre pour faire la demande d'une pompe pour un village?

- 1=oui
- 2=non

E) Avez-vous déjà fait une demande auprès des Services Régionaux de l'eau?

- 1=oui
- 2=non

F) Si oui: quelle était/est le délai d'attente (en mois)?

G) Si oui: La participation financière du village a-t-elle été donnée?

H) Si non: envisagez-vous de la faire?

- 1=oui
- 2=non

I) Y a-t-il suffisamment d'eau disponible en saison sèche pour tout le village?

- 1=oui
- 2=non

J) Certaines structures viennent-elles régulièrement dans votre village désinfecter les puits?

- 1=oui
- 2=non

K) Si oui, lesquelles?

L) Vous arrive-t-il de constater de nombreux cas de diarrhées dans le village?

1=oui

2=non

M) Si oui, quelles sont les mesures que vous prenez?

N) Entre le forage et le puits moderne, quel type de point d'eau le village préférez-vous au village?

1=forage

2=puits

O) Pourquoi?

11.2. Übersichtstabelle Ergebnisse

Tabelle 35: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte *Salmonella* Stämme und Analyseergebnisse, alphabetisch nach Serotypen sortiert. Stämme aus Wasser- sind blau und Stämme aus Stuhlproben rot markiert. PT = traditioneller Brunnen, PM = moderner Brunnen, MA = Tümpel, JA = Tonkrug zur Wasserlagerung im Haushalt, st. = menschlicher Stuhl, e = eBurstGroup, prov. = provisorische Gruppe, S = sensibel, I, II, III = Resistenzmuster

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Expres- sions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
83 KAK-3	Abaetetuba	11 : k : 1,5	564	-	n.d.	S	19.10.04	PT	Kaki Koka
5 KAK-SR	Amoutive	28 : d : 1,5	529	e144	9	S	14.11.03	PM	Kaki Koka
123 KOB-5	Amoutive	28 : d : 1,5	n.d.	e144	n.d.	S	23.07.07	PT	Kobrikonto
129 TIR-8	Amoutive	28 : d : 1,5	628	e144	n.d.	S	12.06.06	PM	Tiranga
115 KAW-2	Anecho	35 : g,s,t : -	619	-	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
1 SEB-14	Apapa	45 : m, t : -	551	-	10	S	2002	PM	Sébou
156 KAK-3***	Apeyeme	8,20 : z ₃₈ : -	613	prov121	n.d.	S	06.05.08	PT	Kaki Koka
182 st.42***	Apeyeme	8,20 : z ₃₈ : -	613	prov121	n.d.	S	06.05.08	st.	Kaki Koka
100 TIR-9	Bamboye	9,46 : b : l,w	566	-	n.d.	S	14.02.05	PT	Tiranga
2 FOM-2	Benue	6,8 : y : l,w	561	-	10	S	19.03.04	PT	Fomerou
144 M1SGui**	Blukwa	18 : z ₄ ,z ₂₄ : -	620	e117	n.d.	S	23.07.07	JA	Guinlerou
145 M4SGui**	Blukwa	18 : z ₄ ,z ₂₄ : -	620	e117	n.d.	S	23.07.07	JA	Guinlerou
104 VAN-8	Braenderup	6,7 : e,h : e,n,z ₁₅	22	e24	n.d.	S	26.04.05	PT	Vanhoui
13 KOB-M	Bredeney	4,12:l,v : 1,7	306	e33 DLV	n.d.	S	25.05.04	MA	Kobrikonto
102 VAN-22	Bredeney	4,12 : l,v : 1,7	306	e33 DLV	n.d.	S	22.03.05	PT	Vanhoui

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
103 VAN-22	Bredeney	4,12 : l,v : 1,7	306	e33 DLV	n.d.	S	26.03.05	PT	Vanhoui
157 KAK-11***	Chandans	11 : d : e,n,x	465	e108	n.d.	S	05.05.08	PT	Kaki Koka
4 PAR-79	Chandans	11 : d : e,n,x	465	e108	9	S	28.02.04	PT	Partago
200 st.97***	Chandans	11 : d : e,n,x	465	e108	n.d.	S	13.05.08	st.	Kaki Koka
152 KAK-SS***	Chester	4,12 : e,h : e,n,x	626	e49	n.d.	S	24.04.08	PM	Kaki Koka
14 PAR-27	Chester	4,12 : e,h : e,n,x	411	e49	n.d.	S	23.02.04	PT	Partago
15 WAS-1	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	411	e49	1	S	21.06.03	PM	Wassa
17 YATA-3	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	411	e49	n.d.	S	28.03.04	PT	Yataniga
16 st.368***	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	411	e49	n.d.	S	Nov. 03	st.	Kaki Koka
173 st.9***	Chester	1,4,12 : e,h : e,n,x	411	e49	n.d.	S	29.04.08	st.	Kaki Koka
99 BET-10	Cotham	28 : i : 1,5	617	e111	n.d.	S	06.05.05	PT	Bétérou
18 GREG	Cotham	28 : i : 1,5	617	e111	1	S	28.10.03	PT	Gregoire
6 st.64***	Cubana	13, 23 : z29 : -	525	-	8	S	Nov.2003	st.	Kaki Koka
32 DEN-M4	Dahomey	47 : k : 1,6	607	-	n.d.	S	2002	MA	Dendougou
150 PAPA-C	Durban	9,12 : a : e,n,Z ₁₅	n.d.	-	n.d.	S	23.02.08	PT	Paparapanga
107 TOR-19	Durban	9,12 : a : e,n,Z ₁₅	572	-	n.d.	S	08.04.05	PT	Torou

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
25 FAKA-1	Egusitoo	1,42 : b : z ₆	622	-	n.d.	S	24.06.03	PM	Fakafaka
82 KAK-S	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	518	prov139	1	S	25.01.05	PT	Kaki Koka
85 KAK-3	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	518	prov139	2	S	25.01.05	PT	Kaki Koka
97 SEB-2	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	518	prov139	2	S	10.04.05	PT	Sébou
96 YEB-56	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	518	prov139	n.d.	S	10.04.05	PT	Yebessi
176 st.22 s2.1***	Elisabethville	3,10 : r : 1,7	518	prov139	n.d.	S	30.04.08	st.	Kaki Koka
101 TOR-11	Essen	4,12 : g,m : -	567	-	n.d.	S	09.03.05	PT	Torou
40 BG-61	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	3	S	13.07.04	PT	Bougou
41 GOU-11	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	n.d.	S	21.08.04	PT	Goumbakou I
124 KOB-8	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	1	S	23.07.07	PT	Kobrikonto
125 KOB-17	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	n.d.	S	23.07.07	PT	Kobrikonto
34 PAR-39	Give	3,10 : l,v : 1,7	524	e67	2	S	12.03.03	PT	Partago
37 PAR-39	Give	3,10 : l,v : 1,7	524	e67	1	S	12.08.03	PT	Partago
39 SUB-4	Give	3,10 : l, v : 1,7	516	e67	1	S	14.04.04	PT	Suburuku
35 SUB-13	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	n.d.	S	16.06.03	PT	Suburuku
24 SUB-65	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	1	S	14.04.04	PT	Suburuku
38 THI-44	Give	3,10 : l,v : 1,7	524	e67	1	S	07.10.03	PT	Thian
118 TIR-10	Give	3,10 : l,v : 1,7	524	e67	1	S	27.09.06	PT	Tiranga
36 VAN-1	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	n.d.	S	08.08.03	PT	Vanhoui
117 YAT-14	Give	3,10 : l,v : 1,7	516	e67	1	S	06.05.06	PT	Yatanifaga
151 KAK-S***	Herston	6,8 : d : e,n,z ₁₅	621	prov107	n.d.	S	24.04.08	PT	Kaki Koka
161 KAK-S***	Herston	6,8 : d : e,n,z ₁₅	621	prov107	n.d.	S	05.05.08	PT	Kaki Koka

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
56 DEN-M1	Hofit	1,9,12 : g,p,u : -	553	prov136	4	S	2002	MA	Dendougou
42 DEN-M3	Hofit	39 : i : 1,5	553	prov136	n.d.	S	2002	MA	Dendougou
26 FOM-5	Infantis	6,7 : r : 1,5	603	-	n.d.	S	19.03.04	PT	Fomerou
44 BET-20	Johannesburg	1,40 : b : e,n,x	515	e38	n.d.	S	21.11.03	PT	Bétérou
43 KAK-9	Johannesburg	1,40 : b : e,n,x	515	e38	2	S	14.11.03	PT	Kaki Koka
155 KAK-19***	Kaneshie	42 : i : l,w	606	-	n.d.	S	24.04.08	PT	Kaki Koka
149 SUB-73	Kibi	16 : Z ₄ ,Z ₂₃ : -	n.d.	-	n.d.	S	23.02.08	PT	Suburuku
91 VAN-16	Kingston	4,12 : g,s,t : -	n.d.	-	n.d.	S	15.12.04	PT	Vanhoui
27 TCHA-3	Kodjovi	47 : c : 1,6	604	e94	n.d.	S	25.03.04	PT	Tchanga- kalgo
88 TIR-7	Kodjovi	47 : c : 1,6	556	e94	n.d.	S	25.01.05	PT	Tiranga
68 YAT-7	Kodjovi	47 : c : 1,6	556	e94	1	S	24.03.04	PT	Yatanifaga
45 KAK-S	Koketime	44 : Z ₃₈ : -	519	prov115	1	S	23.02.04	PT	Kaki Koka
81 KAK-S	Koketime	44 : Z ₃₈ : -	519	prov115	1	I	14.12.04	PT	Kaki Koka
112 KAK-S	Koketime	44 : Z ₃₈ : -	519	prov115	n.d.	S	20.09.05	PT	Kaki Koka
153 KAK-3	Koketime	44 : Z ₃₈ : -	519	prov115	n.d.	S	24.04.08	PT	Kaki Koka
175 st.22 s1.1***	Koketime	44 : Z ₃₈ : -	519	prov115	n.d.	S	30.04.08	st.	Kaki Koka
28 PAR-113	Landau	30 : i : 1,2	571	-	n.d.	S	08.03.04	PT	Partago
148 M1SGui**	Luke	47 : g,m : -	517	prov105	n.d.	S	20.08.07	JA	Guinlerou
163 KAK-V***	Luke	47 : g,m : -	517	prov105	n.d.	S	13.05.08	MA	Kaki Koka
127 KPES-1	Luke	47 : g,m : -	517	prov105	2	S	25.09.06	PM	Kpessou
128 KPES-3	Luke	47 : g,m : -	517	prov105	n.d.	S	02.06.06	PT	Kpessou

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
46 PAR-87	Luke	1,47 : g,m : -	517	prov105	7	S	28.02.04	PT	Partago
47 PAR-88	Luke	1,47 : g,m : -	517	prov105	1	S	28.02.04	PT	Partago
122 WEW-3	Luke	47 : g,m : -	517	prov105	2	S	07.12.06	PM	Wewe
48 NGL-12	Minnesota	21 : b : e,n,x	548	e77	n.d.	S	28.07.04	PM	Nagaile
22 PAR-42	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	4	S	18.02.04	PT	Partago
52 SEB-M2	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	6	S	2002	MA	Sébou
50 SUB-5	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	6	S	08.08.03	PT	Suburuku
49 SUB-5	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	n.d.	S	28.04.03	PT	Suburuku
21 SUB-17	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	5	S	16.06.03	PT	Suburuku
105 VAN-12	Muenster	3,10 : e,h : 1,5	321	e36	1	S	14.02.05	PM	Vanhoui
53 NGL-41	Neukoelln	6,7 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	609	-	n.d.	S	30.08.04	PT	Nagaile
54 DJE-5	Nima	28 : y : 1,5	520	e16	1	S	05.07.03	PT	Djehou
61 GREG	Nima	28 : y : 1,5	520	e16	n.d.	S	21.08.04	PT	Gregoire
106 VAN-15	Nima	28 : y : 1,5	520	e16	1	S	26.04.05	PT	Vanhoui
55 SUB-22	Nima	28 : y : 1,5	520	e16	1	S	27.04.04	PT	Suburuku
120 KAK-SR	Nima	28 : y : 1,5	521	prov109	2	S	17.03.06	PM	Kaki Koka
51 st.THEKLA	Nima	28 : y : 1,5	521	prov109	2	S	2004	st.	-
84 KAK-3	Oakland	6, 7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	14.12.04	PT	Kaki Koka
134 KAK-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	14.03.07	PT	Kaki Koka
131 KAW-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
132 KAW-3	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	14.03.07	PT	Kpawa
133 KAW-9	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
135 KAW-10	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
142 KAW-22	Oakland	6, 7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
126 SEB-6	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	27.07.07	PM	Sébou
98 YEB-55	Oakland	6,7 : z : 1,6	605	prov143	n.d.	S	10.04.05	PT	Yebessi
20 st.116***	Offa	41 : z ₃₈ : -	528	-	8	S	Nov.2003	st.	Kaki Koka
146 YAT-5	Parakou	1,42 : l,w : z ₃₅	549	e97	n.d.	S	15.04.03	PT	Yatanifaga
60 YAT-5	Parakou	1,42 : l,w : z ₃₅	549	e97	n.d.	S	08.08.03	PT	Yatanifaga
86 KAK-11	Plymouth	9,46 : d : z ₆	565	-	n.d.	S	25.01.05	PT	Kaki Koka
62 VAN-16	Poano	1,6,14,25 : z : l,z ₁₃ ,z ₂₈	550	prov87	n.d.	S	28.03.03	PT	Vanhoui
63 VAN-16	Poano	1,6,14,25 : z : l,z ₁₃ ,z ₂₈	550	prov87	n.d.	S	08.08.03	PT	Vanhoui
12 DJE-5	Pomona	28 : y : 1,7	520	e16	1	S	14.06.04	PT	Djehou
64 PAPA-1	Pomona	28 : y : 1,7	514	e16	n.d.	S	21.06.03	PM	Paparapanga
19 ONK-46	Poona	13,22 : z : 1,6	608	-	n.d.	S	20.01.04	PT	Onklou
57 DEN-2	Rostock	1,9,12 : g,p,u : -	10	e53	4	S	2002	PM	Dendougou
58 DEN-5	Rostock	1,9,12 : g,p,u : -	10	e53	n.d.	S	2002	PM	Dendougou
59 KAW-M4	Rubislaw	11 : r : e,n,x	553	prov136	n.d.	S	2002	MA	Kpawa
136 KAW-12	Rubislaw	11 : r : e,n,x	562	prov122	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
137 KAW-18	Rubislaw	11 : r : e,n,x	562	prov122	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
139 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	562	prov122	n.d.	S	26.07.06	PT	Kpawa
138 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	562	prov122	n.d.	S	04.05.06	PT	Kpawa
140 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	n.d.	-	n.d.	S	04.09.06	PT	Kpawa

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Expres- sions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
114 KAW-19	Rubislaw	11 : r : e,n,x	562	prov122	n.d.	S	26.09.06	PT	Kpawa
141 KAW-20	Rubislaw	11 : r : e,n,x	n.d.	-	n.d.	S	07.12.06	PT	Kpawa
143 KAW-23	Rubislaw	11 : r : e,n,x	n.d.	-	n.d.	S	07.12.06	PT	Kpawa
23 st.193***	Sangera	16 : b : e,n, z ₁₅	527	prov113	9	S	Nov.2003	st.	Kaki Koka
30 st.163***	Sangera	16 : b : e,n, z ₁₅	527	prov113	1	S	Nov.2003	st.	Kaki Koka
29 KAK-M2	Saphra	16 : y : 1,5	552	-	n.d.	S	30.08.04	MA	Kaki Koka
79 BANI-1	Spp.I monophas.	28 : b : -	623		n.d.	S	07.12.04	PM	Banigri
69 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	560	-	n.d.	S	06.05.03	MA	Dama
70 DAM-M	Spp.I monophas.	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	560	-	n.d.	S	12.08.03	MA	Dama
72 KPG-1	Spp.I monophas.	6,8 : i : -	531	prov120	n.d.	S	06.05.03	PT	Kperu-Guera
73 KPG-1	Spp.I monophas.	6,8 : i : -	531	prov120	n.d.	S	12.08.03	PT	Kperu-Guera
65 PAR-35	Spp.I monophas.	47 : c : -	556	e94		S	12.03.03	PT	Partago
66 PAR-35	Spp.I monophas.	47 : c : -	556	e94	n.d.	S	12.08.03	PT	Partago
67 PAR-41	Spp.I monophas.	47 : c : -	556	e94	n.d.	S	18.02.04	PT	Partago
71 TCHA-2	Spp.I	1,4,12 : l,w : -	610	-	n.d.	S	25.03.04	PT	Tchanga- kalgo

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
	monophas.								
110 VAN-23	Spp.I	47 : c : -	604	e94	n.d.	S	26.04.05	PT	Vanhoui
	monophas.								
31 YAT-6	Spp.I	47 : z ₄ ,z ₂₃ : -	n.d.		n.d.	S	29.04.03	PT	Yatanifaga
	monophas.								
121 THI-48	Spp.I rauh	-	n.d.		n.d.	II	23.07.07	PM	Thian
130 KAW-2	Spp.I rauh	-	562	prov122	n.d.	S	27.09.06	PT	Kpawa
111 DOG	Takoradi	6,8 : i : 1,5	531	prov120	2	S	28.02.05	PT	Dogué
80 IGER-3	Takoradi	6,8 : i : 1,5	555	-	n.d.	S	02.12.04	PT	Igbere
108 THI-2	Takoradi	6,8 : i : 1,5	531	prov120	12	S	28.02.05	PT	Thian
92 VAN-24	Takoradi	6,8 : i : 1,5	531	prov120	5	S	20.10.04	PT	Vanhoui
93 VAN-24	Takoradi	6,8 : i : 1,5	531	prov120	2	S	29.10.04	PT	Vanhoui
74 YEB-7	Takoradi	6,8 : i : 1,5	602	-	11	S	12.12.03	PT	Yebessi
33 BG-11	Teshie	1,47 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	530	prov112	n.d.	S	2002	PT	Bougou
75 KAK-3	Teshie	1,47 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	530	prov112	1	S	14.11.03	PT	Kaki Koka
177 st.23 s1.1***	Teshie	1,47 : l,z ₁₃ ,z ₂₈ : e,n,z ₁₅	530	prov112	n.d.	S	30.04.08	st.	Kaki Koka
209 st.136***	Typhi	9, 12, Vi : d : -	2	e13	n.d.	S	19.05.08	st.	Kaki Koka
76 st.198***	Typhi	9, 12, Vi : d : -	2	e13	9	III	Nov.2003	st.	Kaki Koka
158 KAK-11***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	19	e1	n.d.	S	05.05.08	PT	Kaki Koka
166 KAK-11***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	19	e1	n.d.	S	19.05.08	PT	Kaki Koka

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Express- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
172 st.4***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	19	e1	n.d.	S	29.04.08	st.	Kaki Koka
197 st.67***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	19	e1	n.d.	S	09.05.08	st.	Kaki Koka
77 SAN-4	Typhimurium	1,4,5,12 : i : 1,2	513	prov135	2	S	11.11.03	PT	Sanson
89 TIR-8	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	513	prov135	n.d.	S	15.12.04	PM	Tiranga
90 TIR-9	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	513	prov135	n.d.	S	15.12.04	PT	Tiranga
160 KAK-Z***	Typhimurium	4,5,12 : i : 1,2	513	prov135	n.d.	S	05.05.08	MA	Kaki Koka
116 TIR-9	Urbana	30 : b : e,n,x	512	e38	n.d.	S	28.02.06	PT	Tiranga
147 GOU-14	Uzaramo	6,14,25 : Z ₄ ,Z ₂₄ :-	n.d.	-	n.d.	S	23.02.08	PT	Goumbakou I
109 BET-7	Vanier	28 : z : 1,5	612	e144	n.d.	S	06.05.05	PT	Bétérou
162 KAK-12***	Vanier	28 : z : 1,5	615	e144	n.d.	S	08.05.08	PT	Kaki Koka
11 KAK-S	Virchow	6,7 : r : 1,2	625	-	n.d.	S	14.11.03	PT	Kaki Koka
154 KAK-18***	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	30.04.08	PT	Kaki Koka
10 ONK-38	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	09.02.04	PM	Onklou
87 SEB-4	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	04.09.04	PT	Sébou
113 TEBO-M	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	23.03.05	MA	Tebo
94 THI-39	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	28.02.05	PT	Thian
95 THI-45	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	28.02.05	PT	Thian
221 st.61 s2.1***	Virchow	6,7 : r : 1,2	n.d.	-	n.d.	S	08.05.08	st.	Kaki Koka
174 st.16***	Virchow	6,7 : r : 1,2	303	e9	n.d.	S	30.04.08	st.	Kaki Koka
119 WEW-3	Virchow	6,7 : r : 1,2	618	e9		S	06.06.06	PM	Wewe
8 KOB-11	Waycross	41 : Z ₄ ,Z ₂₃ :-	611	-		S	06.11.03	PT	Kobrikonto

Stamm- Bezeichnung*	<i>Salmonella</i> Serotyp	Antigenformel	ST (MLST)	Gruppe	Expess- ions-Typ	Antibio- gramm	Datum Proben- nahme	Art der Quelle	Dorf
9 PNS-29	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -	554	-		S	30.08.04	PT	Penesoulou
7 st.109	Waycross	41 : z ₄ ,z ₂₃ : -	526	-	8	S	Nov.2003	st.	Kaki Koka
78 SUB-72	Wil	6,7 : d : l,z ₁₃ ,z ₂₈	563	-		S	27.04.04	PM	Suburuku
3 YAT-6	<i>S. bongori</i>	V 66 : z ₄₁ : -	n.d.	-		S	12.08.03	PT	Yatanifaga
205 st.119***	<i>unbekannt</i>	30 : b : z ₆	627	-		S	16.05.08	st.	Kaki Koka

11.3. Sequenzen neu identifizierter MLST-Allele

aroC

Allel 148

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTGGACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 149

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTATACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGTG
ACGGTATGGCAAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTGGACCGACTGGATGCG
GACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTA
ACGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 150

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGTG
ACGGTGGTGGCGAGCGGCGTGCCGGTAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTGGACCGACTGGATGCG
GACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTA
ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 165

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGGTGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGATTTTGGACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATTAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 166

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTATACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGTG
ACGGTATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTGGACCGACTGGATGCG
GACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTA
ACGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 167

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTATACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAACTGATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTGGACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 168

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGGTGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 169

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGATTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 170

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 171

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGTCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 172

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGTGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 173

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
ACGGTATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
GACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 174

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGAA
ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCCG
CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTGACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
CGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGGCGAACCAGGTTTTTACCGACTGGATGCGG
ACATCGCCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCGAAGGATTTAA
CGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 175

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
 CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
 ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGTATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATCCCG
 CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCAGACAACTT
 GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGTG
 ACGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGCG
 GACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCCAAGGATTTA
 ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 176

GTTTTTCGTCCGGGGACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTG
 GCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGA
 AATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCC
 GCTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCGGACAAAC
 TTGACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGT
 GACGGTATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGC
 GGACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCCAAGGATTT
 AACGTGGTGGCGCTGCGTGCCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 177

GTCTTTCGTCCGGGGACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTG
 GCGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATTGCCAAGA
 AATACCTGGCGGAAAAGTTCGGCATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGATATTCC
 GCTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCGGACAAAC
 TTGACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTACTCCATCGGCGCGAAAAGT
 GACGGTATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGTTTTTGACCGACTGGATGC
 GGACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCCAAGGATTT
 AACGTGGTGGCGCTGCGTGCCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 178

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
 CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
 ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGTATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGTGACATCCCG
 CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCGGACAACTT
 GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGTACTCCATCGGCGCGAAAAGTGA
 CCGTATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGATTTTGACCGACTGGATGCGG
 ACATCGCCATGCGCTGATGAGCATCAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCCAAGGATTTAA
 CGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

Allel 179

GTTTTTCGTCCGGGACACGCGGATTACACCTATGAGCAGAAATACGGCCTGCGCGATTACCGTGG
 CGGTGGACGTTCTTCCGCGCGTGAAACCGCGATGCGCGTAGCGGCAGGGGCGATCGCCAAGAA
 ATACCTGGCGGAAAAGTTCGGTATCGAAATCCGCGGCTGCCTGACCCAGATGGGCGACATCCCG
 CTGGAGATTAAGACTGGCGTCAGGTTGAGCTTAATCCGTTCTTTTGTCCCGATGCAGACAACTT
 GACGCGCTGGACGAAGTATGCGCGCGCTGAAAAAAGAGGGCGACTCCATCGGCGCGAAAAGTG
 ACGGTGATGGCGAGCGGCGTGCCGGCAGGGCTTGCGGAACCGGATTTTGACCGACTGGATGCG
 GACATCGCCATGCGCTGATGAGCATTAATGCGGTGAAAGGCGTGGAGATCGGCCAAGGATTTA
 ACGTGGTGGCGCTGCGCGGCAGCCAGAATCGCGATGAAATCACGGCGCAGGGT

dnaN**Allel 150**

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
 CGCGGAAATCTTTGATATCTGCCGCGGCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
 AGGTGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGATGCGGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
 GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
 GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
 TGCTGTTTGAACGGAAGGCAGCGAACTGCCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
 GTGCTCAATGCCGCTGGAGCGTCTTACCAGCCACTCGGTGATTGTGCCCGTAAAGGTGTG
 ATTGAAGTATGCGTATGCTCGACGGCGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 151

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCGCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGTTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCAACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGTTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 153

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGTTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 154

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 155

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATTTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 156

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGACATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 157

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 158

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGTGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGACG

Allel 159

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTTGACGGTGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 160

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 165

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
GGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTC
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 166

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGTTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 168

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGCGCCACTACCGTGCCGG
CACGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
GGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGTTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 169

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACGCTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGCGAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGTCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTTGACGGTGGCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 170

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACTGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCTCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 172

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCAACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGTTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 178

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGTTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCAACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGTTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTGA
TTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGGTGTGCG

Allel 179

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGCAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTTACCTAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGTGCGGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 180

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCAGGCGCCACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
GGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGTAGCGAACTGCGCACTGTCGCGACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAAGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

Allel 181

ATGGAGATGGTCGCGCGCGTTACGCTTTCTCAGCCGCATGAGCCGGGTGCTACTACCGTGCCGG
CGCGGAAATTCCTTTGATATCTGCCGCGGCCTGCCGGAGGGCGCGGAGATTGCCGTTTCAAGTTGGA
AGGCGATCGGATGCTGGTGCCTTCTGGCCGTAGCCGCTTCTCGCTGTCTACACTGCCTGCCGCC
GATTTCCCGAATCTTGACGACTGGCAAAGCGAAGTTGAATTTACGCTGCCGCAGGCCACGATGAA
GCGCCTGATTGAAGCGACCCAGTTTTCGATGGCCCATCAGGATGTGCGCTACTACTTAAACGGTA
TGCTGTTTGAACGGAAGGCAGCGAACTGCGCACTGTTGCGACCGACGGCCACCGCTGGCGGT
GTGCTCAATGCCGCTGGAGGCGTCTTTACCCAGCCACTCGGTGATTGTGCCGCGTAAAGGCGTG
ATTGAACTGATGCGTATGCTCGACGGCGGCCGAAAACCCGCTGCGCGTGCG

hemD**Allel 125**

GCGACACTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCTGTCGCCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGCGCCGAAGTCAGTTTTTG
TGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 126

GCGACTCTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
TGAATGTTATCAACGACGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACACTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 127

GCGACGCTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
TGAATGTTATCAACGACGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 128

GCGACGCTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
TGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCACGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 129

GCGACACTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGTGGCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
GTGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 130

GCGACACTGACGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGACGCTGATTTTTCGCTG
CAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
GAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

Allel 131

GCGACGCTCGCGGAAAACGATCTGGTTTTTGCCTTTTCACAGCACGCCGTGCGCTTTGCTCACGC
CCAGCTCCAGCGGGATGGCCGAAACTGGCCTGCGTCGCCGCGCTATTTTCGCGATTGGCCGCACC
ACGGCGCTCGCCCTTCATACCGTTAGCGGGTTCGATATTCGTTATCCATTGGATCGGGAAATCAG
CGAAGCCTTGCTACAATTACCTGAATTACAAAATATTGCGGGCAAACGCGCGCTGATTTTTCGCTG
GCAATGGCGGCCGCGAACTGCTGGGCGAAACCCTGACAGCTCGCGGAGCCGAAGTCAGTTTTTG
TGAATGTTATCAACGATGTGCGAAACATTACGATGGCGCGGAAGAAGCGATGCGCTGGCATACTC
CGGGCGTAACAACGCTTGTGTTACCAGCGGCGAGATGTTGCAA

hisD**Allel 157**

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
TCCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCC
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCG
CAGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 163

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 183

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCA
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 184

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
TCCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCAGGTGATCCTGCTGACGCCGGATGCTGACATTGCC
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAGCTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCG
CAGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 185

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCGGATGCTGACATTACCCG
CAAGGTAGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 186

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTGCGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAACCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTTCGTGCGTCTGACCTGCTC
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTC

Allel 187

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTGACCTGCTC
TCCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCC
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTTGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGC
AGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 188

ATTGCGGGATGCCAGAAGGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTTGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 189

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCAGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCTGAGCACGGCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCAGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 190

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 197

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCTGAGCACGGCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTTGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACTGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 198

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAACCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCTGAGCACGGCCGGATTTCGAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTTGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGC
AGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTAATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 199

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTC
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTTGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 201

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTGTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 203

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTCCCAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAGCTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCG
AGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 204

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 205

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGTCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
TCCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTCCCAGGTGATCCTGCTGACGCCGGATGCTGACATTGCCCG
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGG
CAGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 206

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTGTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTAATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 207

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTGTGGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTCGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTCCCAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 208

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACCTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 210

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 217

ATTGCGGGATGTCAGAAGGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAACCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 218

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTAATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 219

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACCTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGTCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
TCCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCGATGCTGACATTGCCCG
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCAGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCAGGC
AGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 220

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
CTATGCGGGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCC
GCTCTGGCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
TGTAACCGAAGCCAAACGTAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCC
GGGCCGTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACC
TGCTCTCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATT
GCCCGCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGC
CCGGCAGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 221

ATTGCGGGATGTCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCGCAACTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAACGCCTCGACGGCGCGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCTGAGCACGGTCCGGATTTCGAGGTGATTCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCGTC

Allel 222

ATTGCGGGATGCCAGAACGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACCTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGTCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGGGCTATCGATATGCCAGCCGGGCC
GTCTGAAGTACTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACACCGGATTTCTGCTGCTTCTGACCTGCTCT
CCCAGGCAGAACACGGTCCGGATTTCGAGGTGATCCTGCTGACGCCTGATGCTGACATTGCCCG
CAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGGCA
GGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTG

Allel 223

ATTGCGGGATGCCAGAAGGTGGTTCTGTGCTCGCCGCCGCCATCGCTGATGAAATCCTCTATGC
GGCACAACCTGTGTGGCGTGCAGGAAATCTTTAACGTCGGCGGCGCGCAGGCGATTGCCGCTCTG
GCCTTCGGCAGCGAGTCCGTACCGAAAAGTGGATAAAATTTTTGGCCCGGCAACGCCTTTGTAAC
CGAAGCCAAGCGTCAGGTCAGCCAGCGCCTCGACGGCGGGCTATCGATATGCCTGCCGGGCC
GTCTGAAGTGTCTGGTGTATCGCCGACAGCGGCGCAACGCGGATTTTGTGCGATCTGACCTGCTC
TCCCAGGCAGAACACGGCCCGGATTCCCAGGTGATTTTGTGCTGACGCCGGATGCTGACATTGCCCG
GCAAGGTGGCGGAGGCGGTAGAACGTCAACTGGCGGAACTGCCGCGCGCGGACACCGCCCGG
CAGGCCCTGAGCGCCAGTCGTCTGATTGTGACCAAAGATTTAGCGCAGTGCCTG

purE**Allel 156**

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGCGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTACTCGGCGTCCCGGTACAAAAGCGCTGCGCTCAGCGGCGTGGATAG
CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATTGCCGAC

Allel 157

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGCGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTACTCGGCGTACCGGTACAAAAGCGCTGCGCTAAGCGGTGTGGATAG
CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCACTGCTGGCAGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTACATC
AGCGCATTGCCGAC

Allel 158

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGCGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCGG
GCAAAAACGCTGGTCCCGGTACTCGGCGTCCCGGTACAAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATA
GCCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
CGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCA
TCAGCGCATTGCCGAC

Allel 159

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCTCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAGA
ACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGCGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTACTCGGCGTCCCGGTACAAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATAG
CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCTGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATCGCTGAC

Allel 164

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGCGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCGG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTACTCGGCGTCCCGGTACAAAAGCGCTGCGCTCAGCGGCGTGGATAG
CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGCAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATCGCTGAC

Allel 165

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
GCAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTCAGCGGCGTGGATA
GCCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGC
CGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCA
TCAGCGCATCGCTGAC

Allel 168

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTCAGCGGCGTGGATAG
CCTTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATTGCCGAC

Allel 169

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATAG
CCTTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATCGCCGAC

Allel 170

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
GCAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATA
GCCTTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
CGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCA
TCAGCGCATCGCTGAC

Allel 171

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATA
CCTTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCACTGCTGGCAGCGCAAATTTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
AGCGCATTGCCGAC

Allel 182

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAACTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCAGAAGAGA
ACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
CAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATAG
CCTTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGCC
GGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATTGCCGAC

Allel 183

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
AGAAGTGGTTTTCCGCTCATCGCACCCCGATAAGCTGTTTCAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGGAATGATTGCG
GCAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTGCCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGCGTGGATA
GCCTTACTCCATTGTGCAGATGCCGCGCGGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAGC
CGGTGCCGCTAACGCCGCCCTGCTCGCCGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCAT
CAGCGCATCGCCGAC

Allel 184

AGCGACTGGGCTACCATGCAATTCGCCGCCGAAATTTTTGAAATTCTGGATGTCCCGCACCATGT
 AGAAGTGGTTTTCCGCCCATCGCACCCCGATAAGCTGTTAGCTTCGCCGAAACGGCGGAAGAG
 AACGGATATCAAGTGATTATTGCCGGCGCGGGCGGGCGGCACACCTGCCGGAAATGATTGCGG
 CAAAAACGCTGGTCCCGGTAAGTACTCGGCGTACCGGTACAAAGCGCTGCGCTAAGCGGTGTGGATAG
 CCTCTACTCCATCGTGCAGATGCCGCGCGCATTCCGGTGGGTACGCTGGCGATCGGTAAAGCC
 GGTGCCGCTAACGCCGCACTGCTGGCAGCGCAGATTCTGGCGCAACACGACGCGGAACTGCATC
 AGCGCATTGCCGAC

sucA**Allel 164**

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGGCCAAATTCC
 CGGGTGCGAAACGTTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGT
 TCGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCT
 GAATGTGCTGATCAACGTAAGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTGACGAATTTGCCGGTAAGC
 ATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACC
 GAAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGG
 TGGTGATGGGCTCCGTGCGCGCCCGTCTGGACCGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGCT
 GCCGATCACTATTACAGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

Allel 165

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGGCCAAATTCC
 CCGGTGCGAAACGTTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGT
 TCGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCT
 GAACGTGCTGATCAACGTAAGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTGACGAATTTGCCGGTAAGC
 ATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACC
 GAAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGG
 TGGTGATGGGCTCCGTGCGTGCCCGTCTGGACCGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTT
 CCCGATCACTATTACAGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

Allel 166

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATTCCC
 GGGTGCGAAACGTTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTT
 CGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTG
 AACGTGCTGATCAACGTAAGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTGACGAATTTGCCGGTAAGCA
 TAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCG
 AAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGT
 GGTGATGGGCTCCGTGCGTGCCCGTCTGGACCGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTTG
 CCGATCACTATTACAGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

Allel 168

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGTTGGAACGTTATCTGGGTGCCAAATTCCC
 CGGTGCGAAACGTTTTCTCGCTCGAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGTT
 CGCCATGCGGGTAACAGTGGCACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCTG
 AACGTGCTGATCAACGTAAGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTGACGAATTTGCCGGTAAGCA
 TAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACCG
 AAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGGT
 GGTGATGGGCTCCGTGCGCGCCCGTCTGGACCGACTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTT
 CCCGATCACTATTACAGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

Allel 169

AAACGCTTCCTGAACGAACTGACCGCCGCTGAAGGGCTGGAGCGTTATCTGGGGCCAAATTCC
 CGGGTGCGAAACGTTTTCTCGCTTGAAGGGGGGAGATGCGCTGATACCCATGCTGAAAGAGATGGT
 TCGCCATGCGGGTAACAGCGGCACTCGCGAAGTGGTGTGGGGATGGCGCACCGCGGTGCGCT
 GAACGTGCTGATCAACGTAAGTACTGGGTAAAAAACCGCAGGATCTGTTGACGAATTTGCCGGTAAGC
 ATAAAGAACATCTGGGTACCGGCGACGTGAAGTATCACATGGGCTTCTCGTCAGATATCGAAACC
 GAAGGCGGTCTGGTTCACCTGGCGCTGGCGTTTAAACCCATCGCATCTGGAAATTGTGAGCCCGG
 TGGTGATGGGCTCCGTGCGCGCCCGTCTGGACAGGCTGGACGAACCGAGCAGCAACAAAGTGTT
 CCCGATCACTATTACAGGCGACGCCGCGGTGACCGGCCAGGGCGTGGTTCAG

thrA**Allel 139**

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 153

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGATGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 154

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 155

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCTGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGC-
GTGTTTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCAGTCTCCTCTGAG
TACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 156

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 157

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 160

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGATGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAGCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTAAAGG

GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGAATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 161

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCACCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 162

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCCGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCAGGAGGAACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 163

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCCGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCAGGAGGAACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 164

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCAGGAGGAACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAATAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 165

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCACCAGGAACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 166

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCAGGAGGAACGCTGATCGGCGCATCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTTAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAATATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCGCGTGTTCGCGCCCATGTCTCGCGCCGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGCTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 175

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTTC
TTCACCCTCGCACCATTACGCCCATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCCGCGTGTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 176

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGTCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGTA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCCGCGTGTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAATACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Allel 177

GTGCTGGGCCGTAATGGTTCCGACTATTCCGCCGCCGTGCTGGCCGCCTGTTTACGCGCTGACT
GCTGTGAAATCTGGACTGACGTCGATGGCGTGTATACCTGTGACCCGCGCCAGGTGCCGGACGC
CAGGCTGCTGAAATCGATGTCCTACCAGGAAGCGATGGAACCTCTTACTTCGGCGCCAAAGTCC
TTCACCCTCGCACCATAACGCCTATCGCCAGTTCAGATCCCCTGTCTGATTAATAAATACCGGCA
ATCCGCAGGCGCCAGGAACGCTGATCGGCGCGTCCAGCGACGATGATAATCTGCCGGTCAAAGG
GATCTCTAACCTTAACAACATGGCGATGTTTAGCGTCTCCGGCCCTGGAATGAAAGGGATGATTG
GGATGGCGGCCGCGTGTTCGCCGCCATGTCTCGCGCCGGGATCTCGGTGGTGCTCATTACCCA
GTCCTCCTCTGAGTACAGCATCAGTTTCTGTGTGCCGCAGAGTGACTGC

Danksagung

Prof. Dr. Martin Krönke und Dr. Dr. Rainer Baginski gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die freundliche Zusammenarbeit der letzten Jahre.

Prof. Dr. Schnetz möchte ich sehr herzlich für ihre Betreuung und Unterstützung in den vergangenen zwei Jahren danken.

Ich bin seit 2003 immer gerne zur Arbeit gekommen und möchte dafür meinen liebenswerten Kollegen des Wasserlabors, Rainer, Günter, Frank, Iris, Olga und Jana danken! Olga, vielen lieben Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Dem Team des *Laboratoire d'Analyses des Eaux IMPETUS* in Parakou habe ich viele tolle Aufenthalte in Benin zu verdanken. Die Zusammenarbeit mit Farouk, Martial, Iliassou, Moissou, Laurence und allen anderen Kollegen in Parakou hat mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Danke an Andreas, Laurence und Elisabeth, die jederzeit für Probleme aller Art ansprechbar waren und so oft geholfen haben, denkbare und undenkbbare Lösungen umzusetzen!

Nicky, Britta und Michael: vielen Dank für euren tapferen Einsatz in Kaki-Koka!

Stefan und Arthur: Danke für eure Hilfe bei der Umsetzung meiner Ideen in SalmEau!

Wiebke Streckel und Prof. Tschäpe vom RKI in Wernigerode möchte ich ganz herzlich danken, dass sie mich in die Arbeit mit den Sop's eingewiesen haben und ein offenes Ohr für alle Fragen hatten. Vielen Dank für Ihr Interesse und Ihre Hilfe!

Prof. Mark Achtman und seiner Arbeitsgruppe möchte ich sehr danken für die freundliche Einladung nach Cork und das Angebot, bei der Auswertung der MLST-Daten behilflich zu sein. Camilla und Tim: herzlichen Dank für eure Gastfreundschaft!

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Christian und natürlich Gero. Danke, dass ihr immer für mich da seid und ich jederzeit bedingungslos auf euch zählen kann!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Martin Krönke betreut worden.

MAZOU, F., A. UESBECK, R. BAGINSKI, 2008 Drinking water supply in the Upper Ouémé Catchment. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.

UESBECK, A., R. BAGINSKI, F. MAZOU, 2008 Bacteriologic Analysis of Drinking Water Sources in the Upper Ouémé Catchment. Judex M. and Thamm H.-P. (ed.): IMPETUS Atlas Benin. Research Results 2000-2007. 3rd edition. Department of Geography, University of Bonn, Germany.

VERHEYEN, J., M. TIMMEN-WEGO, R. LAUDIEN, I. BOUSSAAD, S. SEN, S. SEN, A. KOC, A. UESBECK, F. MAZOU, H. PFISTER, 2009 Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. Appl Environ Microbiol. 75 (9): 2798-801