

## 2 Literaturübersicht

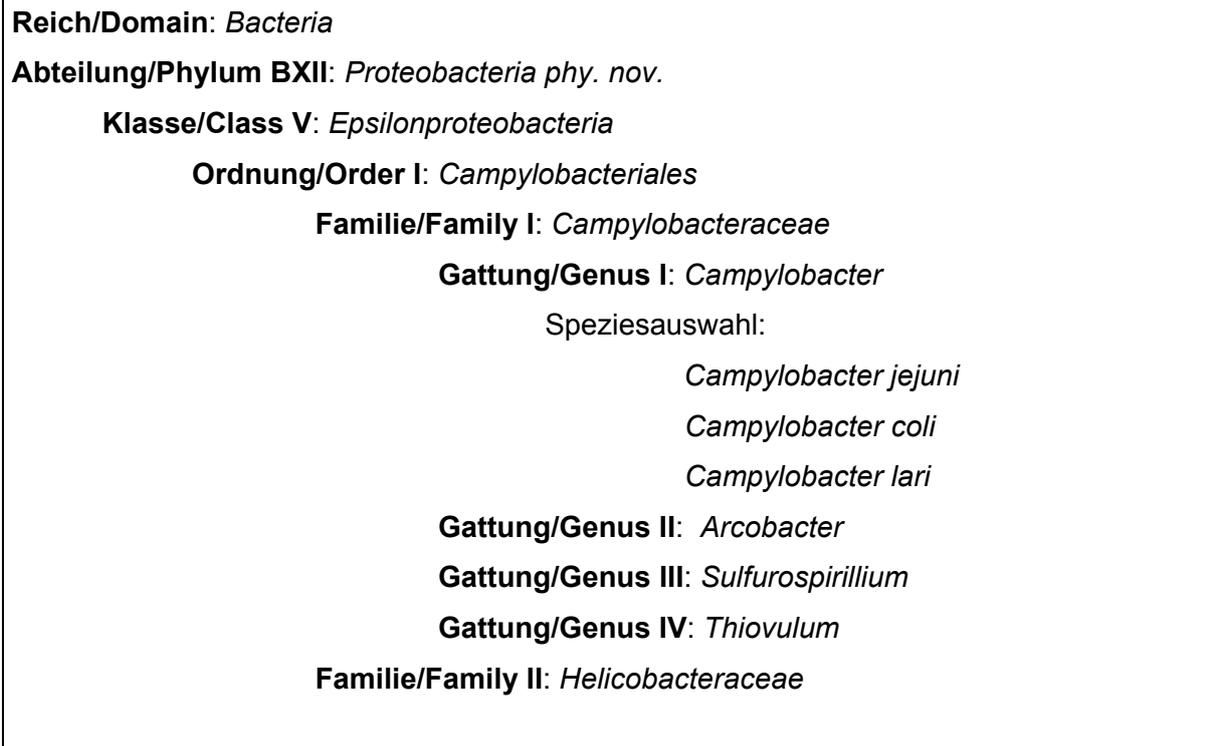
### 2.1 Historischer Überblick und Taxonomie

Nicht züchtbare, spiralförmige Bakterien wurden bereits 1886 von Theodor Escherich im Zusammenhang mit Säuglingsdiarrhoe sowie bei durchfallerkrankten jungen Katzen beschrieben und gezeichnet (ESCHERICH, 1886). Neben der Entdeckung von *Escherichia coli* kann ihm mit hoher Wahrscheinlichkeit die Erstbeschreibung von *Campylobacter* zugerechnet werden, auch wenn er dessen Bedeutung zu Lebzeiten nie vollständig erkannt hat. So wird nach dem gegenwärtigen Wissensstand die Mitteilung von MCFADYEAN und STOCKMAN (1909) über das Vorkommen eines vibrioähnlichen Erregers beim seuchenhaften Verwerfen der Schafe allgemein als Erstbeschreibung von wahrscheinlich *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* und somit der *Campylobacter*-Spezies überhaupt angesehen (KIST, 1986). SMITH und TAYLOR (1919) konnten morphologisch ähnliche Bakterien in abortierten Rinderföten nachweisen und bezeichneten sie als *Vibrio jejuni*. Als Erstbeobachtung des Erregers beim Menschen gilt dessen Beschreibung durch LEVY (1946) während einer Gastroenteritisepidemie (KIST, 1986). Aber erst KING (1957) erkannte, dass Vibrionen zwei Gruppen umfassten, wobei neben der einen als *Vibrio fetus* beschriebenen Gruppe die zweite Gruppe Keime beinhaltete, die sich bei Temperaturen um 42 °C vermehren und hauptsächlich bei Diarrhoepatienten gefunden werden. SEBALD und VÉRON (1963) grenzten diese zweite Gruppe, auch als „closely related vibrios“ bezeichnete, aufgrund unterschiedlicher Guanodin-Cytosin-Gehalte der DNA von der Spezies *Vibrio cholerae* ab und bezeichneten sie als *Campylobacter*.

Seit 1966 wurden die *Campylobacter*-Spezies aufgrund morphologischer Untersuchungen im Elektronenmikroskop der Familie *Spirillaceae* zugeordnet (RITCHIE et al., 1966). Diese Zuordnung wurde erst durch molekularbiologischer Methoden wieder revidiert, sodass nach grundlegender Überarbeitung der Nomenklatur in den 90er Jahren die Einteilung der *Campylobacter* aufgrund genetischer Untersuchungen erfolgte (VANDAMME et al., 1991; VANDAMME und DE LEY, 1991, VANDAMME und GOOSSENS, 1992).

In der aktuellen Veröffentlichung von BERGEYS MANUAL<sup>®</sup> werden derzeit 16 *Campylobacter*-Spezies mit 8 Subspezies unterschieden (GARRITY et al., 2002), wonach die Gattung *Campylobacter* der Familie *Campylobacteraceae* innerhalb der Ordnung der *Campylobacteriales* zugeordnet wird. Sie fällt unter die Klasse der *Epsilonproteobacteria*.

Neben dem Genus *Campylobacter* befinden sich weitere Genera in der Familie: *Campylobacteraceae*: *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* und *Thiovulum*. Nah verwandt mit der Familie der *Campylobacteraceae* sind die *Helicobacteraceae*, die gleichfalls der Ordnung *Campylobacteriales* angehören. Die zurzeit gültige Taxonomie wird in Abbildung 1 noch einmal verdeutlicht.



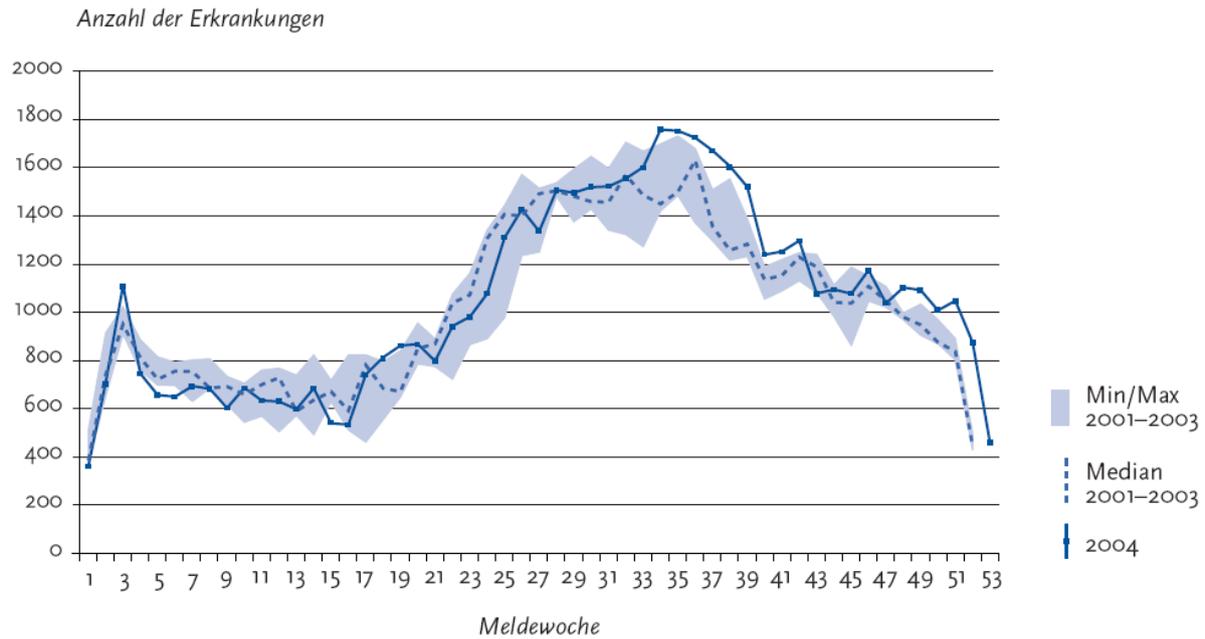
**Abbildung 1:** Taxonomie von *Campylobacter* (angelehnt an GARRITY et. al., 2002)

Erst Jahrzehnte später, nachdem der Keim zeitweise in Vergessenheit geraten war, ist es durch systematische Studien und mit der Entwicklung neuer, effektiver Nährböden gelungen die Bedeutung von *Campylobacter* zu erkennen (KIST, 2002) sowie gramnegative, sporenlose Bakterien auf Antibiotika-haltigen Selektivnährmedien allgemein zugänglich zu machen (SKIRROW, 1977; LAUWERS et al., 1978; BLASER et al., 1979; BRUCE et al., 1980; BOLTON und ROBERTSON, 1982; CHAN und MACKENZIE, 1982; CHRISTOPHER et al., 1982; DOYLE und ROMAN, 1982; PARK et al., 1983; HUTCHINSON und BOLTON 1984; KARMALI et al., 1986).

## 2.2 Epidemiologie

### 2.2.1 Vorkommen beim Menschen

Seit Inkrafttreten des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz, IfSG) am 01. Januar 2001, sind durch *Campylobacter* spp. verursachte Durchfallerkrankungen beim Menschen erstmals bundesweit meldepflichtig geworden. Das Robert Koch-Institut (RKI) erfasst die Meldungen zeitnah im wöchentlichen Turnus. Insgesamt wurden 55.745 *Campylobacter*-Enteritiden für das Jahr 2004 dem RKI übermittelt, wobei eine saisonale Häufung von Ende Juni bis Mitte November zu verzeichnen war (Abbildung 2). Die Campylobacteriose, zumeist ausgelöst durch die Spezies *Campylobacter jejuni* (59,4 %) ist in Deutschland nach der Salmonellose die häufigste potenziell mit Lebensmitteln assoziierte Erkrankung (ANONYMUS, 2005).



**Abbildung 2:** Übermittelte *Campylobacter*-Enteritiden nach Meldewoche, Deutschland, 2004 (n=55.745) im Vergleich mit den Vorjahren (ANONYMUS, 2005)

Aufgrund von epidemiologischer Untersuchungen und Analysen von Ausbruchsgeschehen (Fallkontrollstudien) wird als wichtigste Infektionsquellen im Bereich der Lebensmittel das Schlachtgeflügel, Eier, Wasser und Rohmilch genannt (SKIRROW et al., 1981; HOOD et al., 1988; SAEED et al., 1993; CORRY und ATABAY, 2001; FROST, 2001). Die Übertragung von *Campylobacter*-Keimen des Schweins auf den Menschen wird von der Arbeitsgruppe GORKIEWICZ et al. (2002) belegt.

Als Infektionsdosis für menschliche Erkrankungen werden sehr niedrige Zahlen im Gegensatz zu anderen Enteritiserregern angegeben. Sie reichen von  $3 \times 10^0$  KbE bis  $5 \times 10^2$  KbE/ml bzw. g Lebensmittel (ROBINSON, 1981; COWDEN, 1993). Die Einhaltung von Hygieneregeln bei der Verarbeitung und beim Verzehr von Geflügelfleisch korreliert mit dem Auftreten menschlicher Enteritiden (OOSTEROM et al., 1984). Die Übertragung von Mensch zu Mensch spielt eine untergeordnete Rolle (BLASER et al., 1981).

Eine akute *Campylobacter*-Infektion verläuft als selbstlimitierende Enteritis. Bakteriämie, Endokarditis, Meningitis, Pankreatitis, septischer Abort und neonatale Sepsis sind selten. Die wichtigste postinfektiöse Komplikation ist das Guillain-Barré-Syndrom, das sich klinisch unter anderem durch nervale Störungen der Muskeln äußert (ANONYMUS, 1998; KIST, 2002).

Die Inzidenz der humane *Campylobacter*iose konnte in Island dadurch gesenkt werden, dass *Campylobacter*-positive Lebensmittelchargen tiefgefroren wurden und erst nach einer Wartezeit in den Handel gelangten (REIERSEN et al., 2002).

Eine ausführliche Übersichtsarbeit wurde von SHANE (2000) erstellt, in der er auf die Epidemiologie und Inzidenz von humaner Campylobacteriose eingeht. Basierend auf Inzidenzraten Mitte der 80er Jahre, entstanden den USA schätzungsweise bis zu 1,4 Mio. US-Dollar an indirekten und direkten Kosten (MORRISON und ROBERTS, 1985), wobei nach SOCKETT und PEARSON (1988) pro Campylobacteriose-Patient ca. 273 Pfund in England aufgebracht werden musste.

### 2.2.2 Vorkommen bei verschiedenen Tierarten

Thermophile *Campylobacter* spp. sind in der intestinalen Flora vieler **Säugetiere** und **Vögel** anzutreffen. In Studien konnten diese Erreger aus dem Fäzes vom gesunden Geflügel (KRSTULOVIĆ et al., 2003), Schweinen (PRESCOTT und BRUIN-MOSCH, 1981; STERN, 1981; STICH-GROH, 1982; MUNROE et al., 1983), Rindern und Schafen (DOYLE und ROMAN, 1982b; MUNROE et al., 1983; GARCIA et al., 1985; ERTAŞ et al., 2003; INGLIS und KALISCHUK, 2003), Hunden und Katzen (BRUCE et al., 1980; SVEDHEM und KAJSER, 1981; SEIFERT und WEBER, 1983; WEBER et al., 1984), Nagetieren (FERNIE und HEALING, 1976; FOX et al., 1981) sowie Kaninchen und Meerschweinchen (PRESCOTT und BRUIN-MOSCH, 1981; WEBER et al., 1982) gefunden werden. Auch das Vorkommen bei Möwen in Deutschland und Großbritannien sowie bei Brief- und Schlachttauben ist beschrieben worden (WEBER et al., 1981; WHELAN et al., 1988; GLÜNDER et al., 1991; JEFFREY et al., 2001; BROMAN et al., 2002).

### Geflügel

Umfangreiche Daten zum Vorkommen von *Campylobacter* spp. liegen ebenfalls für das schlachtbare **Geflügel** vor, wobei zumeist die Spezies *Campylobacter jejuni* dominiert (HARTOG et al., 1983; OOSTEROM et al., 1983a; WEMPE et al., 1983; GLÜNDER, 1989, 1989a, 1993; GREGORY et al., 1997; KRAMER et al., 2000; HAFEZ et al., 2001; IBRAHIM und MOHAMED, 2003). Die hierbei ermittelten Isolierungsraten sind sehr unterschiedlich, wobei eine Besiedelung der Tiere bis zu 100 % festgestellt wird (Tabelle 1). In 82,9 % der von PEZZOTTI et al. (2003) untersuchten Broiler konnte der Genus *Campylobacter* nachgewiesen werden. 42,5 % der Geflügeltupferproben einer 2-Jahres Pre-harvest Kontrollstudie in Dänemark wiesen ebenfalls diese Keimart auf (WEDDERKOPP et al., 2001).

Der Erreger wird für das Schlachtgeflügel als Kommensale bezeichnet (STERN, 1992). Er tritt in Größenordnungen bis  $10^6$  KbE/g in Geflügelfäzes und auf Geflügelfleisch  $10^4$  bis  $10^6$  KbE/g auf (HARTOG et al., 1983; OOSTEROM et al., 1983; WEMPE et al., 1983; CORRY et al., 2001). Für kommerziell gehaltene Puten werden hohe Nachweisraten angegeben (LUECHTEFELD und WANG, 1981), wobei mit fortschreitender Mastperiode die Kolonisierung der Gesamtherde zum Mastende zu beobachten ist (WINDHAUS, 1997; FALLON et al., 2001).

Eine vertikale Übertragung von *Campylobacter* spp. spielt beim Mastgeflügel eine unbedeutende Rolle. Sie wird von einigen Autoren ausgeschlossen bzw. für unwahrscheinlich gehalten (SHANKER, 1990, VAN DE GIESSEN et al., 1992; GREGORY et al., 1997). Eine horizontale Übertragung kann über Futter, Einstreu, andere freilaufende Tiere, Insekten oder durch den Landwirt selbst entstehen (SMITHERMAN et al., 1984; JONES et al., 1991; VAN DE GIESSEN et al., 1992; PEARSON et al., 1993, HALD et al., 2004). Mögliche Eintragsquellen in den Stall werden von Autoren näher beschrieben (SHANE, 2000).

Durch Makrorestriktionsanalysen konnte eine enge genetische Verwandtschaft zwischen humanen und aviären *Campylobacter*-Stämmen nachgewiesen werden, wobei dies eine potentiell mögliche Infektionsquelle für den Menschen indiziert (NADEAU et al., 2002).

**Tabelle 1:** Isolierungsraten von *Campylobacter* spp. aus Schlachtgeflügel und Geflügelschlachtprodukten (modifiziert nach AHO und HIRN, 1988)

Land	Probenanzahl	positive Proben [%]	Quelle
Deutschland	120	82	ALTMAYER et al., 1985
	630	14	GEILHAUSEN, 1996
	111	45,9	ATANASSOVA, 1999
	300	38,7	HAFEZ, 2000
	612 Herden	46 (Faeces)	BORCK et al., 2001
	1250	40,7 (Faeces)	DANG et al., 2001
	400	87 (Faeces)	FALLON et al., 2001
	398	56,8 (Faeces)	URSINITSCH et al., 2001
	140	15,7	BRECHTEL, 2002
	2325	40,7 (Faeces)	NADEAU et al., 2002
Italien	100	100	COMI et al., 1984
Nordirland	107	87 (94 frisch, 77 gefroren)	MOORE et al., 2002
USA	25	20	JONES et al., 1991
	184	70,7 (Huhn)	ZHAO et al., 2001
	172	14 (Truthahn)	

### Andere Tiere

Wiederkäuer stellen gleichfalls eine potentielle Quelle für *Campylobacter*-Infektionen dar. ATABAY und CORRY (1998) fanden heraus, dass 79 % der **Rinder** einer Herde mit *Campylobacter* spp. belastet sein können. In ihrer Untersuchung sind 11 % der Tiere mit der Spezies *Campylobacter jejuni* detektiert worden. Bei MANSER und DALZIEL (1985) sind hingegen 24 % der Rinder und 22 % der **Schafe** *Campylobacter*-positiv befundet, bei PEZZOTTI et al. (2003) trifft dies auf 53,9 % der untersuchten Rinder zu.

*Campylobacter jejuni* wurde auch bei Rindermastitiden und -aborten beschrieben (MORGAN et al., 1985; DIKER et al., 1990; VAN DONKERSGOED et al., 1990).

Eine Vielzahl von Faktoren, die ein Vorkommen von *Campylobacter* spp. bei Rindern beeinflussen können, werden von BEACH et al. (2002) diskutiert. Hierbei werden unter anderem der Einfluss von Haltungs- und Aufzuchtbedingungen betrachtet. Stress innerhalb der Tiergruppe nimmt hiernach bei der Verbreitung von *Campylobacter* spp. in der Herde eine unbedeutende Stellung ein. Adulte Tiere beherbergen diesen Keim gewöhnlich nicht (GIACOBONI et al., 1993; HOAR et al., 1999; BEACH et al., 2002).

**Schweine** stellen auch ein Reservoir für thermophile *Campylobacter* spp. dar (HARVEY et al., 1999; YOUNG et al., 2000; GUÉVREMONT et al., 2001), wobei zumeist die Spezies *Campylobacter coli* dominiert (MANSER und DALZIEL, 1985; KRAMER et al., 2000; GUÉVREMONT et al., 2001; PEARCE et al., 2003).

63,5 % der Schweine, die in den Jahren 2000 und 2001 in Italien untersucht wurden, wiesen demnach *Campylobacter* spp. auf (PEZZOTI et al., 2003).

Mit zunehmendem Alter der Schweine nimmt die Keimzahl im Kot ab (WEIJTENS et al., 1999). Jedoch berichten andere Studien, dass mit zunehmendem Alter der Ferkel eine erhöhte Isolationsrate zu verzeichnen ist (WEIJTENS et al., 1997). Das Frühabsetzen der Ferkel von der Muttersau konnte jedoch das Vorkommen in den Beständen reduzieren (HARVEY et al., 2000).

Neuere Untersuchungen zeigen auf, dass auch die **Schwarzkopf-Seemöwe** (*Larus ridibundus*) als Reservoir wahrscheinlich eine nicht unbedeutende Rolle spielt, da von ihr isolierte *Campylobacter jejuni* Stämme Stammverwandtschaften zu Masthähnchen- und Humanisolaten aufweisen (BROMAN et al., 2002).

Insekten, speziell Käfer und Hausfliegen, können sehr wahrscheinlich *Campylobacter* spp. übertragen (ROSEF und KAPPERUD, 1983; JACOBS-REITSMA, 1997; WILLIS und MURRAY, 1997).

### 2.2.3 Vorkommen im Lebensmittel

Aufgrund der zuvor beschriebenen *Campylobacter*-Reservoirs wird diese Keimart in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes gefunden (HABA, 1993; HÄNNINEN et al., 2003). KRAMER et al. (2000) stellen bei Untersuchungen von rohem Fleisch und Innereien verschiedener Tierarten fest, dass Fleisch vom Geflügel die höchste *Campylobacter*-Kontaminationsrate aufweist (83,3 %), gefolgt von Lamm- (72,9 %), Schweine- (71,7 %) und

Ochsen-Leber (54,2 %). Dabei stellten sie fest, dass in ca. 30 % der Proben gleichzeitig unterschiedliche Stämme von *Campylobacter* spp. auftraten.

KWIATEK et al. (1990) stellten bei 80,3 % der Hühnerproben, 48,0 % der Entenproben, 38,0 % der Gänseproben und 3,0 % der Truthahnproben thermophile *Campylobacter* spp. fest. Auch bei Fleischproben vom Schwein und Rind wurden sie fündig.

PEZZOTTI et al. (2003) fanden in den Untersuchungsjahren 2000 und 2001 gleichfalls hohe Isolationsraten in Geflügel- (81,3 %) und Schweinefleisch (10,3 %). Rindfleisch wies eine niedrige Isolationsrate von 1,3 % auf. ZHAO et al. (2001) fanden ebenfalls nur niedrige Nachweisraten in Schweine- (1,7 %) und Rindfleisch (0,5 %).

### **Geflügelfleisch und Geflügelprodukte**

Kanadische Forscher konnten in 38,2 % und 73,7 % von ihnen untersuchten Geflügel- bzw. Truthahnkarkassen *Campylobacter* isolieren (LAMMERDING et al., 1988). 42 % der Truthahnleberproben wiesen bei Untersuchungen von LOEWENHERZ (1995) diesen pathogenen Keim auf. Geflügelprodukte aus dem Handel waren zu 18,8 % kontaminiert.

Prävalenzen im Geflügel sowie hohe Kontaminationsraten bei Geflügelfleischerzeugnissen (50 %) und Putenleber (66 %) werden ebenso durch andere Autoren beschrieben (SHANE, 1991; LOEWENHERZ-LÜNING et al., 1996; OPFER et al., 2000) (Tabelle 2).

Die ermittelte Detektionsrate hängt entscheidend von der Probengröße und dem Infektionslevel der jeweiligen Tierspezies ab. 25 g Proben erbrachten deutlich höhere Detektionsraten als 10 g oder 1 g Proben. 67,9 % der Hühnerfleischproben ( $n_{\text{gesamt}} = 156$ ) wiesen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* auf (TOKUMARU et al., 1990).

ATANASSOVA und RING (2001) isolierten bei 21 % von 640 gekühlten **Geflügelfleischproben** *Campylobacter* spp.. Dabei stellten *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* die am häufigsten isolierten Spezies dar. Diese Größe korreliert mit den Angaben des Trendberichts, der jährlich vom Nationalen Referenzlabor für die Epidemiologie der Zoonosen (BfR-Berlin) verfasst wird. Hiernach sind 24 % der untersuchten Geflügelplanproben in den deutschen Bundesländern *Campylobacter*-positiv befundet worden (HARTUNG, 2000).

Auch Fasanenfleisch ist zu 25,9 % mit thermophilen *Campylobacter* belastet (ATANASSOVA und RING, 1999). Bei Untersuchungen zum Vorkommen von *Campylobacter* spp. an deutschen und bulgarischen Geflügelschlachthöfen sind 42,5 % bzw. 29 % der untersuchten Proben (Herz-, Leber-, Brust- und Keulenmuskulatur sowie Gastrointestinaltrakte) *Campylobacter*-positiv befundet worden (ATANASSOVA et al., 2003). Auch die Ergebnisse aus anderen europäischen Ländern stützen diese Funde. So isolierten DOMÍNGUEZ et al. (2002)

aus 49,5 % ( $n_{\text{gesamt}} = 198$ ) der Geflügelfleischprodukte aus dem spanischen Einzelhandel thermophile *Campylobacter* spp..

Geflügelkarkassen und Geflügelteile können nach dem Schlachtprozess mit  $10^2$  bis  $10^4$  KBE an *Campylobacter* pro Gramm kontaminiert sein (HARTOG et al., 1983; OOSTEROM et al., 1983; WEMPE et al., 1983, BERRANG et al., 2001). Gefrorene Schlachtkörper weisen meist niedrige *Campylobacter*-Keimzahlen auf (DUFRENNE et al., 2001). Bei rohen, gefrorenen Hähnchenschenkeln bzw. Hähnchenfleisch sind Isolationsraten von 17 % ( $n_{\text{gesamt}} = 6$ ) bzw. 22 % (NORBERG, 1981; LOEWENHERZ-LÜNING et al., 1996) gefunden worden, erhitzte Lebensmittel (ready-to-eat-foods) erwiesen sich als *Campylobacter*-frei (MOORE et al., 2002). Andere Autoren weisen hingegen auf die potentielle Gefahr einer Infektion im Umgang mit erhitzten ready-to-consume Produkten, z. B. gegrilltes Huhn, hin. Kreuzkontaminationen sind hierbei besonders zu befürchten (QUIÑONES-RAMÍREZ et al., 2000).

**Tabelle 2:** Isolationsraten in Geflügelprodukten

Probe	Gesamtprobenanzahl	<i>Campylobacter</i> -positive Proben [%]	Quelle
Huhn	203	80,3	KWIATEK et al., 1990
Pute	236	3	
Gans	200	38	
Ente	200	48	
Huhn	184	70,7	ZHAO et al., 2001
Pute	172	14	
Hühnerbrust	198	83,3	KRAMER et al., 2000
Hühnerbein	96	65	URSINITSCH et al., 2001
Hühnerbrust	96	64	
Hühnerleber	96	66	

**Geflügelinnereien** (Leber, Herz, Magen, Hals) können ebenso kontaminiert sein. Ausschlaggebend ist hier eine Kreuzkontamination im Schlachtprozess, wobei beim Eviszerationsprozess *Campylobacter*-haltiger Kot oder bei der Entfederung *Campylobacter*-haltige Federn auf andere Schlachtprodukte gelangen können (OOSTEROM et al., 1983; JONES et al., 1991; BERNDTSON et al., 1992). Auch ist eine Übertragung durch die Luft möglich. So kann bisher nicht infiziertes Geflügelfleisch ohne direkten Kontakt zu infiziertem Fleisch oder verschmutzten Einrichtungsgegenständen mit den Erregern infiziert werden. Dies berichteten POSCH et al. (2004) vom Hygieneinstitut der Universität Graz anlässlich einer Konferenz in Prag.

CHRISTOPHER et al. (1982) berichten, dass 50 % der von ihnen untersuchten Geflügellebern belastet waren. Der Nachweis von *Campylobacter* spp. ist auch bei einer Fall-Kontrollstudie zur Ermittlung der Infektionsquelle in Geflügelleber erbracht worden, wobei bei frischer Leber höhere *Campylobacter*-Konzentrationen festgestellt wurden als bei tiefgefrorener Leber (ANONYMUS, 1995a).

Auch BAUMGARTNER et al. (1995) fanden hohe Kontaminationen in frischen (31 %) und gefrorenen (16 %) Leberproben, die nicht nur auf die Oberfläche beschränkt blieben.

Über das Vorkommen und Überlebensverhalten von *Campylobacter jejuni* auf der Schale von Hühnereiern berichten KOLLOWA und KOLLOWA (1989).

### **Andere Lebensmittel**

Gastroenteritis-Ausbrüche, die auf in **Rohmilch** vorhandene *Campylobacter* spp. zurückzuführen sind, treten in regelmäßigen Abständen immer wieder auf (ANONYMUS, 2000a, THURM et al., 2000). Es wird angenommen, dass das Vorkommen in der Milch meist durch fäkale Verunreinigungen während des Melkprozesses oder *Campylobacter*-Mastitiden der Kuh zu erklären ist (LANDER und GILL, 1980). Eine Pasteurisation kann milchbedingte Ausbrüche beim Menschen verhindern (BLASER et al., 1983a). So wurde im Vergleich zu anderen Produkten eine geringe Isolierungsquote von 2,9 % bei Milchprodukten erzielt (LOEWENHERZ-LÜNING et al., 1996).

Auch Lebensmittelprodukte vom Schwein sind mit *Campylobacter* spp. belastet. Ein nach dem Schlachtprozess auf die Schlachtpartie einwirkender Kühlprozess stellt sich als ein effektiver Critical Control Point für diesen Mikroorganismus heraus, wobei nach einem 12-stündigen Kühlprozess auf der Schlachtkörperoberfläche keine *Campylobacter*-Keime mehr nachzuweisen waren (PEARCE et al., 2003).

Der *Campylobacter*-Nachweis gelang ebenso aus **See- und Frischwasser** (EL-SHERBEENY et al., 1986), **Trinkwasser**, höchstwahrscheinlich fäkal kontaminiert durch Wildvögel (MENTZING, 1981; PALMER et al., 1983; HÄNNINEN et al., 2003), **Muscheln** (VLIEGENTHART, 1994; ENDTZ et al., 1997), **Speisefisch** (GRIFFIN et al., 1983) und **Pilzen** (HARRIS et al., 1986; DOYLE und SCHOENI, 1986).

Aus der Tatsache, dass *Campylobacter* spp. weltweit verbreitet ist und die Infektionsquellen vielschichtig sind, wären Handelsrestriktionen bei positiv- befundenen Lebensmitteln unangemessen (SHANE, 2000).

### **2.3 Eigenschaften und Tenazität**

Bakterien der Gattung *Campylobacter* sind gramnegative, spiralig gewundene bis s- oder kommaförmige, schlanke Stäbchen mit 0,2 bis 0,9 µm Breite sowie 0,5 bis 5 µm Länge. Oftmals liegen sie aneinander und bilden z-förmige Figuren aus. Die monotriche bzw. bipolar-monotriche Begeißelung (Abbildung 3) führt zu einem charakteristischen korkenzieherähnlichen Bewegungsablauf (SMIBERT, 1984, VANDAMME und

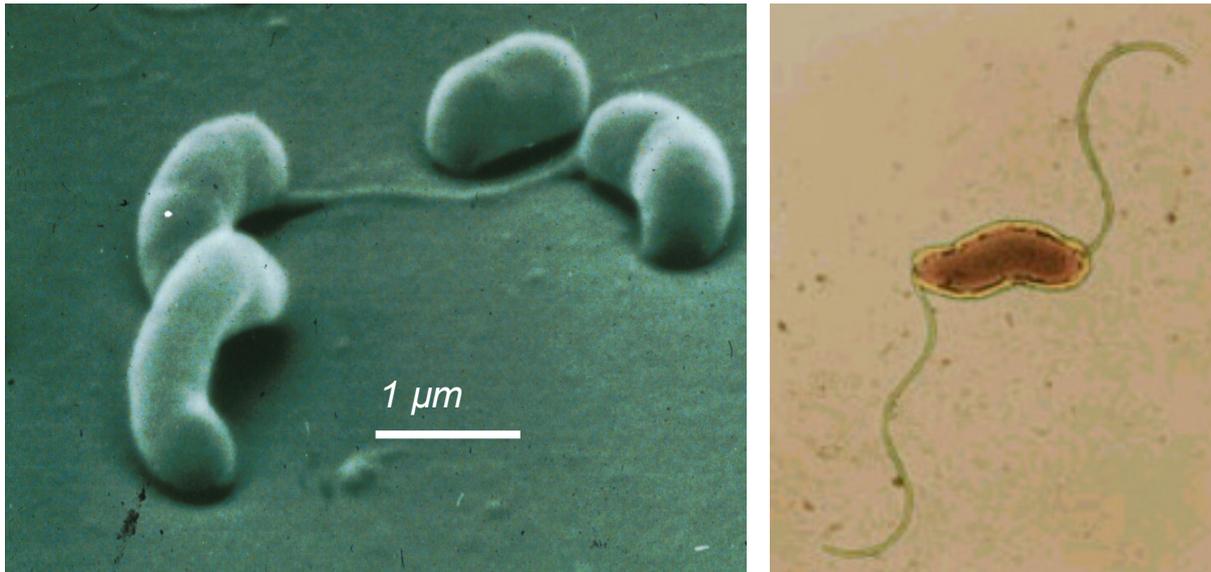
DE LEY 1991, Nachamkin et al., 1992). Sie besitzen einen respiratorischen Stoffwechsel, verwerten Kohlenhydrate weder fermentativ noch oxidativ und ernähren sich von Zwischenprodukten des Trikarbonsäurezyklus sowie von Aminosäuren (ANONYMUS, 1994a).

*Campylobacter* spp. kann 2 bis 4 Wochen unter feuchten, Sauerstoff-reduzierten Bedingungen (mikroaerobe Atmosphäre mit 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) bei 4 °C überleben. Bei -20 °C können sie über 2-5 Monate, unter Raumtemperatur nur wenige Tage überleben (BLASER et al., 1980; CASTILLO und ESCARTIN, 1994; FRICKER und PARK, 1989; NACHAMKIN et al., 1992).

Die Widerstandsfähigkeit von *Campylobacter* spp. gegenüber äußeren Einflüssen ist stammspezifisch. Die **Tenazität** variiert zwischen den Stämmen (JONES et al., 1991a; TERZIEVA und MC FETERS, 1991; BUSWELL et al., 1998).

*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* sowie *Campylobacter upsaliensis* besitzen bezüglich der **Temperatur** ihr Wachstumsoptimum bei ca. 42 °C bis 43 °C und werden auf Grunde dessen der Gruppe der thermophilen *Campylobacter* spp. zugeordnet (PENNER, 1991). Bei Temperaturen über 45 °C und unter 31 °C wird keine Vermehrung beobachtet, sodass sich *Campylobacter* in gekühlt gelagerten Lebensmitteln in der Regel nicht vermehren (ARWANA, 1987). Auch DOYLE und ROMAN (1981) stellten keine Vermehrung unter 30 °C fest. Bei niedrigen Temperaturen haben diese Bakterien eine höhere Überlebensfähigkeit als bei höheren Temperaturen (KOIDIS und DOYLE, 1983). Das Überleben im Lebensmittel ist bei Raumtemperatur auf wenige Tage beschränkt (WUNDT et al., 1985). Durch stundenlanges Warmhalten ungenügend erhitzter Geflügelgerichte kommt es zur Anreicherung des Erregers im Produkt (BRYAN und MCKINLEY, 1974; BRYAN, 1988).

Die Ermittlung des **D-Wertes** von *Campylobacter* Reinkulturen ergab in vitro bei 55 °C einen D<sub>55</sub>-Wert von  $\bar{x} = 40$  Sekunden, bei 60 °C einen D<sub>60</sub>-Wert von  $\bar{x} = 4,5$  Sekunden. Eingebettet in und auf einer Lebensmittelmatrix ergeben sich die in Tabelle 3 ausgewiesenen D-Werte nach DOYLE und ROMAN (1981), KOIDIS und DOYLE (1983), sowie YANG et al. (2001). Von GILL und HARRIS (1982) wird berichtet, dass *Campylobacter*-Keime schnell inaktiviert werden, wenn sie einer Temperatur von 50 °C ausgesetzt werden. Bei einer Temperatur von 60 °C ist eine dezimale Reduktion der Keimzahl innerhalb einer Minute festzustellen (D<sub>60</sub>-Wert = 1 min).



**Abbildung 3:** Rasterelektronische (links) und mikroskopische (rechts) Aufnahme von *Campylobacter* spp. (Photoquellen: siehe Literaturverzeichnis)

**Gefrieren** hat nur partielle Auswirkungen auf die Zellfunktion und *Campylobacter jejuni* konnte in diesem Temperaturprozess 2 bis 8 Wochen überleben (TOMANCOVA et al., 1991). GILL und HARRIS (1984) fanden heraus, dass Temperaturen von  $-18\text{ °C}$  über 7 Tage die *Campylobacter*-Anzahl in künstlich kontaminiertem Hamburgerfleisch um eine log-Stufe reduzieren, ZHAO et al. (2003) konnten eine Reduktion von  $3\text{ log}_{10}\text{ KbE/g}$  bei einer  $-20\text{ °C}$  Behandlung von Geflügelfleisch über 8-12 Wochen feststellen. *Campylobacter*-Kulturen in flüssigem Medium können jedoch mit Glycerinzusatz bei  $-70\text{ °C}$  über mehrere Monate bis zu einem Jahr eingefroren werden. GORMAN und ADLEY (2004) verglichen fünf Techniken zur Langzeitaufbewahrung von *Campylobacter jejuni* bei  $-20\text{ °C}$  und  $-85\text{ °C}$ . Sie stellten fest, dass einfache und billige Methoden mit Glasperlen den kommerziell erhältlichen Cryobanksystemen überlegen sein können.

So erwies sich ein Präservierungsmedium aus 15 % Glycerol mit 85 % Nährbouillon Nr. 2 oder das so genannte FBP-Medium bei Temperaturen von  $-86\text{ °C}$  als besonders zweckdienlich für lange Aufbewahrungszeiten bis zu einem Jahr. Letzteres Medium ist auch bei  $-20\text{ °C}$  bestens geeignet, *Campylobacter*-Keime für mehrere Monate aufzubewahren. Tiefgefrieren bei  $-196\text{ °C}$  führt jedoch zu substanzieller Reduktion (ZHAO et al., 2003).

Aufwendigere Methoden zur Langzeitpräservierung sind zum Beispiel die Flüssigtrocknung (MALIK und LANG, 1996) oder auch Gefriertrocknung mit Stickstoff (MALIK und GHERNA, 1988).

**Tabelle 3:** Hitzeresistenz von *Campylobacter*-Keimen

Matrix	Temperatur [°C]	D-Wert [min]	Literatur
Milch (fettarm)	48	12,8	DOYLE und ROMAN (1981, 1982b)
	50	4,4	
	53	1,56	
	55	1,00	
Rinderhackfleisch	50	6,28	KOIDIS und DOYLE (1983)
	56	0,96	
	58	0,35	
Lammfleisch	50	13,3	
	55	1,23	
	60	0,26	
Fäzes (Huhn)	52	1,96-10,82	OOSTEROM et al. (1983)
	60	0,18-0,39	
Geflügelhaut	50	2,1	YANG et al. (2001)
	60	0,5	
Wasser	50	4,0	
	60	<0,2	

In **vakuumierten** und **modifiziert begasten Lebensmittelverpackungen** (modified atmosphere packaged products - MAP) überlebt *C. jejuni* in Abhängigkeit von der Gaszusammensetzung längere Zeit (HÄNNINEN et al., 1984; STERN et al., 1986; TOMANCOVA et al., 1987). So konnten *Campylobacter*-Keime in Hamburgerfleisch, abgepackt unter einer modifizierten Gasatmosphäre und gelagert bei 4 °C über 28 Tage, von FINALI et al. (1996) nach 21 Tagen nachgewiesen werden. Lagerversuche bei 20 °C von LEE et al. (1998), bei denen *Campylobacter*-Keime auf Geflügelhaut aufgebracht wurden, zeigten, dass sich der Einfluss sowohl einer Vakuum- als auch Kohlendioxidatmosphäre auf das Überleben von *Campylobacter jejuni* innerhalb der ersten 14 Tage positiv auswirkt.

Optimale Bedingungen herrschen bei einem **pH-Wert** zwischen 6,5 und 7,5 (DOYLE und ROMAN, 1981). Insbesondere gegenüber organischen Säuren reagiert *Campylobacter jejuni* empfindlich (SMULDERS, 1987). Beim Vorliegen von pH-Werten unter 5,5 können sich *Campylobacter* spp. nicht mehr vermehren. In Abhängigkeit von der Temperatur tolerieren *Campylobacter* bei Kühltemperatur niedrigere pH-Werte. Unterhalb von einem pH-Wert von 4,9 sterben *Campylobacter*-Keime schnell ab (BLASER et al., 1980).

Gegenüber **Abtrocknung** sind *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* empfindlich (HUDSON, 1979; LUECHTEFELD et al., 1981; DOYLE und ROMAN, 1982; BARREL, 1984). Niedrige  $a_w$ -Werte (Wasseraktivität) hemmen Wachstum und Vermehrung von *Campylobacter jejuni* (DOYLE und ROMAN, 1982; Arwana, 1987). So wächst *Campylobacter jejuni* nach CHIRIFE und BUERA (1996) nicht unter einem  $a_w$ -Wert von 0,90. Bei  $a_w$ -Werten kleiner 0,97 sterben die Keime ab (DOYLE und ROMAN,

1982). Neben einer Sauerstoffzufuhr verhüten eine ausreichende Erhitzung oder ein Kochsalzzusatz von mehr als 2 % die Vermehrung der Erreger im Lebensmittel (BEUTLING, 1998).

Ultraviolette **Strahlung** sowie Röntgenstrahlung töten *Campylobacter* spp. nach kurzer Einwirkdauer sicher ab (BUTLER et al., 1987). So sind *Campylobacter* spp. nach 10 Minuten UV-Bestrahlung nicht mehr anzüchtbar gewesen (OBIRI-DANSO et al., 2001).

Eine Zusammenstellung der wichtigsten **Einflussfaktoren**, welche das Wachstum thermophiler *Campylobacter* spp. beeinflussen können, findet sich in der Tabelle 4.

Die einzelnen Einflussfaktoren können hierbei nicht isoliert betrachtet werden, sondern stehen oftmals in Abhängigkeit zueinander. So ist der pH- wie auch die Kochsalztoleranz von *Campylobacter* spp. temperaturabhängig (BLASER et al., 1980; HÄNNINEN, 1981; CHRISTOPHER et al., 1982a; DOYLE und ROMAN, 1982a).

Das Überleben von *Campylobacter* spp. unter verschiedenen Bedingungen und Einflüssen wurde in den letzten Jahren ausgiebig erforscht. Dies ist für die Aufklärung epidemiologischer Aspekte hilfreich, wobei mögliche Lebens- und Überlebensbereiche von *Campylobacter* aufgezeigt werden konnten.

So beschreiben ARWANA und SCHEIBNER (1988) sowie BHADURI und COTTRELL (2004) in Modelluntersuchungen das **Überleben** von *Campylobacter jejuni* auf Fleischoberflächen. BHADURI und COTTRELL betonten dabei, dass Kühllhaltung und/oder Gefrieren des Geflügelfleisches kein Ersatz für den richtigen hygienischen Umgang oder ausreichendes Durchkochen sind.

ACUFF et al. (1986) betonten in diesem Zusammenhang die Wichtigkeit des Faktors „Kreuzkontamination“ im Umgang mit frischem Putenfleisch unter verschiedenen Koch- und Zubereitungsmethoden. So gehen BOUCHER et al. (1998) auf die mögliche erhöhte Überlebensfähigkeit und Übertragung potentiell pathogener *Campylobacter jejuni* von Küchen-Holzschneidbrettern auf verzehrfertige Speisen ein. Schützende Effekte des Holzes sind zunächst in der physikalischen Struktur des Materials begründet. Gerade die relativ großen Holzporen bieten den Keimen Schutz vor negativen Umwelteinflüssen. Insbesondere im Bereich des Temperaturoptimums des Keims ist nach BOUCHER et al. die Gefahr einer Übertragung von Keimen vom Schneidbrett auf andere Speisen sehr wahrscheinlich. Eher unwahrscheinlich ist die Übertragung, wenn das Schneidbrett bzw. die Raumtemperatur suboptimale Temperaturen für den Keim bietet, beispielsweise unter 25 °C.

Entscheidend für das Überleben von *Campylobacter* spp. ist die Oberflächenstruktur der Kontaktfläche wie auch ihr Verschmutzungsgrad. So weisen MATTICK et al. (2003) auf die Überlebensfähigkeit pathogener Keime und das Risiko einer Kreuzkontamination innerhalb der Küche hin. Im Mittelpunkt stehen Küchenutensilien wie Abwaschschwämme und Geschirr, die unterschiedliche Abwaschprozedere mit verschiedenen Wassertemperaturen durchlaufen. Das Überleben von Pathogenen wird unter verschiedenen Gesichtspunkten näher erläutert. Sie stellen unter anderem fest, dass die Gefahr einer Übertragung pathogener Keime über die mit kontaminiertem Wasser gespülten Tellern auf die verzehrsfertige Speise gering ist.

KUSUMANINGRUM et al. (2004) kommen in ihrer quantitativen Analyse zu der Erkenntnis, dass Kreuzkontaminationen in der privaten Küche effektiv durch ein Hygienemanagement durchbrochen werden können. Die Verwendung unterschiedlicher Schneidbretter für rohes und erhitztes Fleisch oder das gewissenhafte Säubern benutzter Küchenoberflächen, auf denen zuvor rohes Geflügelfleisch zubereitet wurden, reduziert die Gefahr einer Exposition mit *Campylobacter*.

Aber auch die Übertragung von *Campylobacter* spp. ohne Kontakt oder Vektorenbeteiligung ist schon nachgewiesen worden. So konnten in allen gezogenen Raumluftproben eines Geflügelschlachthofes *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden (POSCH et al., 2004)

Ein auf der Arbeitsfläche der Küche vorhandener Biofilm kann zudem das Überleben des Keims günstig beeinflussen (TRACHOO et al., 2002; DE CESARE, 2003). Auch die Geflügelhaut besitzt eine protektive Rolle für *Campylobacter* gegenüber Umwelteinflüssen und verlängert so die Überlebensfähigkeit des Keimes (LEE et al., 1998; SOLOW, 2003).

Die **Überlebenszeit** von *Campylobacter* in Abhängigkeit von der Temperatur in verschiedenen Matrices zeigt die erweiterte Tabelle 4 nach BEUTLING (1998). Neuere Ergebnisse zur Absterberate von *Campylobacter jejuni* auf Früchten, Obst und Salaten beschreiben KARENLAMPI und HÄNNINEN (2004).

Unter ungünstigen Bebrütungs- und Lagerungsbedingungen, wobei hier insbesondere Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, niedrige pH-Werte, Trockenheit ( $a_w$ -Wert der Speise), Strahlung, Sauerstoffeinwirkung oder Nährstoffentzug zu nennen sind, können sich die Erreger in kokkoide, zum Teil nicht bewegliche Formen verwandeln.

Bei Aufbewahrung von *Campylobacter jejuni* bewachsenen Agarplatten unter normaler Raumtemperatur waren bereits nach einem Tag kokkoide Zellmorphologien dieser Spezies

zu verzeichnen und nach weiteren 24 h waren nur noch kokkoide Formen vertreten (KARMALI, 1981, 1982). Diese Formen sind meist nicht vermehrungsfähig (BLASER et al., 1980; SKIRROW und BENJAMIN, 1980; NACHAMKIN et al., 1992) und ihr Zustand wird als **viable but nonculturable state** (VBNC) bezeichnet.

**Tabelle 4:** Wachstumsgrenzen für *Campylobacter* spp. (modifiziert nach BEUTLING, 1998)

Einflussfaktor	Minimum	Maximum	Literatur
Temperatur	30 °C	k. A.	ACUFF et al. (1986)
	31 °C zur Hemmung zur Abtötung	45 °C 52-60 °C 60 °C, 15 min	ARWANA (1987) SLAVIK et al. (1995) SVEDHEM et al. (1981) SLAVIK et al. (1995)
	k. A.	> 60 °C, 1 min 74 °C	TOMANCOVA et al. (1991) BRYAN und MCKINLEY (1974)
pH-Wert	6,0	9,0	ARWANA (1987)
	5,5-5,9	k. A.	GILL und HARRIS (1984)
	6,2 (in Milch)	k. A.	GILL und HARRIS (1984)
Sauerstoffgehalt	> 15 %	21 %	SIMMONS und GIBBS (1979) HODGE und KRIEG (1994) McNAMARA (1994)
Kochsalz	0,5 %	2 %	ARWANA (1987)
Nitrit	0,001 %	0,04 %	ARWANA (1987)

Das Bakterium kann sich aus diesem Stadium wieder zur vollständigen Lebensfähigkeit mit uneingeschränkter metabolischer Aktivität sowie Reproduktionsmöglichkeit entwickeln (PARK, 2002).

Dieses relativ neue Konzept, wobei hierbei das Bakterium weiterhin infektiös bleibt und unter konventionellen Methoden häufig nicht mehr anzüchtbar ist, wurde schon von ROSZAK et al. (1984) näher untersucht, die Studien über das Überleben von *Salmonella enteritidis* durchführten. Grundlegende, physiologische Untersuchungen zum VBNC Status von *Campylobacter* spp. führten ROLLINS und COLWELL (1986) und THOLAZAN et al. (1999) durch. Noch nicht völlig geklärt ist, ob es sich beim VBNC um eine degenerative Zellform oder um eine Art Schutzmechanismus vor Stressfaktoren handelt (BOUCHER et al., 1994; ANONYMUS, 1994a; THOLOZAN et al., 1999; THOMAS et al., 1999; PARK, 2002).

Tabelle 5: Überleben von *Campylobacter* spp. in und auf verschiedenen Matrices

Matrix	Temperatur [°C]	Überlebenszeit	Literatur
Trinkwasser	+5	6 Tage	WUNDT et al. (1985)
	+22	4 Tage	
	-20	einige Wochen	
Steriles Wasser	+4	mind. 48 Stunden	KANG (1981)
	+20	12-24 Stunden	
	+37	6-12 Stunden	
Sterile Milch	+37	1 Tag	MOORE und MADDEN (2001)
		Mindest. 6 Tage	
Steriles Leberhomogenat	+4	mind. 10 Tage	WATERMAN (1982)
	+15	mind. 10 Tage	
	+37	24 h	
Rohmilch	k. A.	10 Tage	OOSTEROM et al. (1982)
	+4	mind. 31 Tage	
Milch	+5	15 Tage	WUNDT et al. (1985)
	+22	7 Tage	
Speiseeis	-20	> 30 Tage	WUNDT et al. (1985)
Fleischbällchen	>70	1 Minute	BOSTAN (2001)
	+4	~9 Tage	
	-18	<20 Tage	
Rindfleisch (gewürfelt)	+4	14 Tage	REFAIE und GALAL (1992)
	-20	42 Tage	
Türkische Rohwurst	+20	3 Tage	BOSTAN et al. (2001)
Rindfleischstücke	-18	mind. 112 Tage	MOORHEAD und DYKES (2002)

Fortsetzung Tabelle 5: Überleben von <i>Campylobacter</i> spp. in und auf verschiedenen Matrices			
Matrix	Temperatur [°C]	Überlebenszeit	Literatur
Putenwurst	+4	6 Tage (Luft) 12-18 Tage (MAP)	PHEBUS et al. (1991)
	+21	ca. 48 Stunden	
Hackfleisch	k.A.	10 Tage	WATERMAN (1982) KANG (1981), TEUFEL (1982) SVEDHEM et al. (1981) KOIDIS und DOYLE (1983) SVEDHEM et al. (1981)
	+4	mind. 72 Stunden	
	+4	1 Woche	
	+4	14 Tage	
	-20	3 Monate	
Hähnchenkarkasse	-20	mind. 64 Tage	OOSTEROM et al. (1983a)
Hähnchenleber		mind. 84 Tage	
Halbes Hähnchen	Mikrowelle (930 Watt)	8-12 Minuten	URADZIŃSKI et al. (1996)
Gefügelhautoberfläche	-20	14 Tage	LEE et al. (1998)
Fäzes (Mensch)	+4	3 Wochen	BLASER et al. (1980)
Eischalenoberfläche	22-24 °C bei 50-55% rel. Feuchte	mind. 34 Stunden	KOLLOWA und KOLLOWA (1989)
	4-7 °C bei 78-80%rel. Feuchte	bis 12,2 Tage	
Serumbouillon	+20	4-5 Tage	ARWANA (1987)
	+4	8 Tage	
	-20	21 Tage	
Wasser	+4	mind. 48 Stunden	TEUFEL (1982)
		12 Stunden	
	+20	24 Stunden	

k. A.: keine Angaben; MAP: Verpackung mit modifizierter Gasatmosphäre

## 2.4 Identifizierung und Nachweismethoden

Die Isolierung und Identifizierung von thermophilen *Campylobacter* spp. wird je nach Land und mikrobiologischem Labor unterschiedlich gehandhabt und verfolgt. Ein ständiger Diskurs, neue Forschungsarbeiten und ihre Ergebnisse führen zu effektiveren Methoden (NEUBAUER, 2001; CORRY et al., 2003; KERAMAS et al., 2004).

Auf nationaler Ebene existiert nach dem LMBG keine § 35-Methode für die Isolation von *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln. Nationale und internationale Methoden, wie die ISO 10272 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Campylobacter* growing at 41.5 °C, die sich derzeit in Revision befindet, die amerikanische BAM-Methode der U.S. Food & Drug Administration (Center for Food Safety & Applied Nutrition), die finnische Methode Nr. 119 des Nordic Committee on Food Analysis (1990), oder die niederländische Richtlinie NEN 6269 liegen als Leitlinien bzw. Empfehlungen vor (ANONYMUS, 1995; HUNT et al., 2000).

### 2.4.1 Transportmedien

Oftmals ist das untersuchende Labor vom eigentlichen Beprobungsplatz weit entfernt, sodass ein Transportmedium benötigt wird. Sein Zweck ist es, externe Stressfaktoren zu minimieren und *Campylobacter* spp. für den **Transport** möglichst lange lebensfähig zu erhalten (SANDVEN et al., 1982; WANG et al., 1983). Solch ein Medium sollte die Bakterien insbesondere vor Austrocknung, toxischen Komponenten, wie Sauerstoff, und Überwuchs durch andere Begleitbakterien schützen.

Eine Vielzahl von Transportmedien wurden von Autoren beschrieben und getestet (LUECHTEFELD et al., 1981; SANDVEN et al., 1982; WANG et al., 1983; AHO et al., 1988). LUECHTEFELD et al. (1981) testeten sechs Medien und zeigten, dass das **Cary-Blair Medium** (CARY und BLAIR, 1964), modifiziert mit einem erhöhten Agaranteil von 16 %, am zweckdienlichsten ist. *Campylobacter* überlebte zu 100 % über drei Tage in Putenkot bei 4 °C. Bei 25 °C waren nach drei Tagen noch 94 % und nach 7 Tagen 85 % nachzuweisen. WANG et al. (1983) zeigten, dass das modifizierte Medium nach CARY-BLAIR auch für Fäzes vom Menschen für den Transport geeignet ist, führen jedoch aus, dass mit Thioglykolat-Bouillon (pH 8,5) oder alkalischem Peptonwasser im Test die beste Konservierung erzielt wird. OYARZABAL et al. (1995) bestätigten die Verwendbarkeit des Cary-Blair Mediums für Geflügelfäzes unter Kühschrankbedingungen. Sie verwendeten hierbei eine Agar-Konzentration von 0,65%. BACHMANN (1998) konnte durch den Einsatz des Cary-Blair Transportmediums die *Campylobacter*-Isolationsrate aus Tierfäzes um 25 % steigern.

Hohe Überlebensraten für den Erreger sowohl aus Reinkulturen, Einmischproben als auch aus natürlich kontaminiertem Blinddarmkot von Mastgeflügel werden durch das **modifizierte**

**Cary-Blair Medium** mit 1% Natriumpyruvat-Zusatz auch durch BARTELT und LUBER (2003) sowie DEDISTE et al. (2003) festgestellt. Es ist kostengünstig, einfach herstellbar und lagerfähig. Bei Kotproben und Proben von Lebensmitteln und Umgebungsproben, in denen wenige Keime zu erwarten sind, sollte immer ein Transportmedium eingesetzt werden (GOOSSENS und BUTZLER, 1992). AHO et al. (1988) testeten vier Transportmedien und fanden heraus, dass das SIFF Medium nach SANDVEN et al. (1982) wie auch das Cary-Blair Medium bei kleinen Inokula bestens geeignet sind.

#### 2.4.2 Klassisch-kulturelle Nachweismethoden

Klassisch-kulturelle Isolationsmethoden für pathogene Mikroorganismen beinhalten normalerweise die Elemente (Vor)-Anreicherung, Isolation auf selektivem Nährmedium, gefolgt von der Subkultivierung verdächtiger Kolonien auf nicht-selektiven Medien sowie einer abschließenden Identifikation der Isolate (HAZELEGER und BEUMER, 1999).

Phänotypisch lassen sich *Campylobacter*-Kolonien durch bestimmte **Wachstums-eigenschaften**, unterschiedliche **biochemischen Reaktionen** sowie ihre **Sensibilität** gegenüber ausgewählten Antibiotika identifizieren und speziesdifferenzieren (Tabelle 7).

So bilden thermophile *Campylobacter* spp. bei einem **Wachstumsoptimum** von 37 °C bis 43 °C auf frischem, noch feuchtem Agar graue bis silbrig-metallisch glänzende Kolonien, wobei ein häufiges Schwärmen über die Agaroberfläche zu beobachten ist und Einzelkolonien hierbei verschmelzen können. Auf älteren, zumeist trockeneren Agarböden, bilden *Campylobacter* spp. überwiegend runde, konvexe, grauglänzende Kolonien aus (SKIRROW und BENJAMIN, 1980). Unter 25 °C ist bei thermophilen *Campylobacter* spp. kein Wachstum zu beobachten.

Zurzeit häufig angewendete Nährböden und ihre Zusammensetzung werden von CORRY et al. (2003) ausführlich geschildert (Tabelle 6). Vergleichende Untersuchungen werden von mehreren Autoren beschrieben (FRICKER, 1983; TRESCHNAK und HELLMANN, 1987; GRIFFITHS und RIBEIRO, 1988; ENDTZ et al., 1991; STERN et al., 1991; MÜLLER und MÜLLER, 1997; WHYTE et al., 2003).

Das ausschlaggebende Kriterium, sich für einen bestimmten Nährboden zu entscheiden, stellt die Matrix dar, aus der *Campylobacter*-Keime isoliert werden sollen. So besitzen Lebensmittelmatrices oder Fäzes eine gänzlich unterschiedliche Begleitkeimflora, sodass die Isolation nur mit Hilfe speziell an diese Matrix angepassten, selektiven Nährboden Erfolg haben wird. Die Zugabe von unterschiedlichen **Antibiotika- und Antimykotikazusätzen** zur Agarbasis in verschiedenen Konzentrationen und Variationen spielen eine entscheidende Rolle. Sie sollen unspezifische Keime im Wuchs hemmen und das Wachstum des Zielkeimes ermöglichen (MÜLLER und MÜLLER, 1997). Selektive Supplemente, die zu

Agarbasen mit Kohle oder Blut zugegeben werden, wurden bereits von SKIRROW (1977) beschrieben.

GUN-MUNRO et al. (1987) verglichen unterschiedliche **Selektivnährmedien**. Dabei wurde eine mit *Campylobacter jejuni* artifiziell kontaminierte Stuhlmatrix verwendet. Sie stellten unter anderem fest, dass die normale Stuhlflora von kohlehaltigen Nährböden deutlich unterdrückt wird. So wurde neben anderen Böden der Nährboden nach KARMALI et al. (1986) sowie der nach HUTCHINSONS und BOLTON (1984) modifizierte CCDA Nährboden (mCCDA, modified Charcoal-Cafazolin-sodium-Deoxycholat-Agar) mit einer hohen *Campylobacter*-Isolationsrate, bei gleichzeitig hoher Unterdrückungsrate der unspezifischen Fäkalflora, besonders herausgestellt. Beides sind blutfreie Böden mit Kohlezusatz, die deutlich selektiver sind als bluthaltige Nährböden (GUN-MUNRO et al., 1987). Auch die Autoren ENDTZ et al. (1991a), ALBERT et al. (1992) und PIERSIMONI et al. (1995) bestätigen diesen Sachverhalt.

In der ISO Norm 10272:1995 wird der Boden nach KARMALI et al. (1986) vorgeschrieben. Die aktuelle Revision der ISO 10272 sieht in einem Entwurf eine gewisse Lockerung vor, sodass zukünftig wohl der mCCDA Nährboden sowie ein vom Labor zusätzlich gewählter Boden genutzt werden kann (ANONYMUS, 2001a). Andere Autoren sehen den mCCDA als eine gute Alternative bzw. Ergänzung zum Nährboden nach KARMALI an (JACOB und STELZER, 1992; GOAK, 2001).

**Tabelle 6:** *Campylobacter*-Selektivnährmedien (gekürzt nach CORRY et al., 2003)

Name	Quelle
Skirrow-Agar	SKIRROW, 1977
Campy BAP	BLASER et al., 1978
Preston-Agar	BOLTON und ROBERTSON, 1982
Campylosetl <sup>®</sup>	bioMérieux
mCCDA	BOLTON et al. 1984, modifiziert von HUTCHINSON und BOLTON, 1984
Karmali-Agar	KARMALI et al., 1986

Weitere häufig verwendete selektive Nährböden sind der nach SKIRROW (1977, modifiziert mit Amphotericinzusatz), der Campy BAP nach BLASER (1978), der Preston Agar nach BOLTON und ROBERTSON (1982) sowie der Campylosetl<sup>®</sup>-Agar (Fa. bioMérieux). Ein blutfreies, günstig herzustellendes halbfestes Medium, in dem es zum deutlichen Schwärmen der *Campylobacter*-Keime kommt, ist von GOOSSENS et al. (1989) entwickelt worden. Aufgrund des Schwärmens ist dieses Medium für quantitative Untersuchungen jedoch ungeeignet.

Neue Methoden zur Isolation von *Campylobacter* spp. sehen neben Blut- auch Antibiotika-freie Nährböden vor. So stellt das Kapadnis-Baseri-Medium von BASERISALEHI et al. (2004) eine mögliche Alternative zu Blut- und Antibiotika-haltigen Böden dar, wobei auch Antibiotika-sensitive Stämme aus Wasser, Nahrungsmitteln und Abwasser isoliert und quantitativ bestimmt werden können.

Zudem werden Strategien entwickelt, um *Campylobacter*-Kolonien noch schneller und einfacher von unspezifischer Begleitkeimflora differenzieren zu können. So lassen neue chromogene, lichtdurchlässige Nährböden *Campylobacter*-Kolonien in tiefem Rot erscheinen. Dies stellt eine effektive Methode dar, *Campylobacter* spp. quantitativ im Direktausstrich bestimmen zu können (LINE, 2001).

Um jedoch auch niedrige Kontaminationsraten von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln, Fäzes oder Oberflächenwasser nachweisen zu können, ist eine **Voranreicherung** notwendig (BAYLIS et al., 2000). So gibt es von verschiedenen Autoren spezielle Untersuchungen für die jeweils zu untersuchende Matrix, durch welche Voranreicherung gute Isolationsraten erzielt werden können.

FRICKER et al. machten schon 1983 vergleichende Untersuchungen zur Isolation von thermophilen *Campylobacter* spp. aus Möwenkot, BAGGERMANN und KÖSTER (1992) aus frischem und gefrorenem Geflügelfleisch sowie Geflügelinnereien, BAYLIS et al. (2000) aus frischem roten und weißen Fleisch sowie Innereien vom Lamm und Geflügel. Für Umweltproben sind von HÖLLER (1991) Voranreicherungen für die optimale Isolation von *Campylobacter* spp. verglichen worden.

Sind hohe Kontaminationsraten von *Campylobacter* und Begleitkeimflora wahrscheinlich kann der Direktausstrich ohne vorausgehende Anreicherung auf Selektivnährboden Erfolg versprechender sein (MUSGROVE et al., 2001).

BARTELT und LUBER (2003) erwähnen jedoch, dass bei Kottupferproben auf den Direktausstrich auf Grund der starken Begleitflora und der geringen Wiederfindungsrate von *Campylobacter* spp. verzichtet werden und immer eine 24 h Anreicherung in Preston-Bouillon vor dem Ausstrich auf Selektivmedien durchgeführt werden sollte.

MOORE (2001) optimierte den Nachweis aus Geflügellebern, indem er die Erkenntnisse aus Voruntersuchungen von MOORE und MADDEN (1998) umsetzte. So sollte nach MOORE bei der Präparation des Probenansatzes ein leberzellschädigender Prozess möglichst unterbunden und auf die Homogenisierung des Probenansatzes, beispielsweise durch ein Beutelwalkmischgerät (Stomacher®), verzichtet werden. Antimikrobiell wirksame Peptide und Proteine verbleiben so in der Leberzelle und wirken sich nicht negativ auf eventuell vorhandene *Campylobacter*-Keime aus (MOORE, 2001).

Wichtige selektive flüssige Voranreicherungen stellen die Preston-Bouillon (BOLTON et al., 1982), Bolton-Bouillon (HUNT et al., 1998), das Medium nach PARK und SANDERS (1991), sowie die Exeter-Bouillon nach DE BOER und HUMPHREY (1991) dar.

DE BOER et al. (1998) fanden bei Vergleichsuntersuchungen heraus, dass Preston-Bouillon und Karmali-Agar für die *Campylobacter*-Isolation aus Geflügelfleisch geeignet ist.

Da neben einer niedrigen *Campylobacter*-Konzentration in der Matrix auch durch äußere Einflüsse geschädigte Zielkeime vorliegen können (siehe Kapitel 2.3), wurden nicht nur spezielle Anreicherungen, sondern auch bestimmte Protokollschematas mit definierten Voranreicherungszeiten zur effektiven Kultivierung **sublethal geschädigter Bakterien**, entwickelt. Exemplarisch seien hier die Arbeiten von HUMPHREY (1986, 1989) sowie HUMPHREY und MUSCAT (1989) genannt, die ein spezifisches Temperaturmanagement mit Vorinkubation der Anreicherungsbouillon beschreiben. In Studien von SCOTTER et al. (1993) sind gefrorene Proben von natürlich kontaminierter Geflügelhaut verwendet worden, bei denen sublethal geschädigte Zellen sehr wahrscheinlich vorliegen. Aufgrund dessen wurde hier eine Voranreicherung verwendet.

Eine ausführliche tabellarische Zusammenfassung von Nährböden und Anreicherungsmedien für die Isolation von thermophilen *Campylobacter* spp. ist von CORRY (1999) und CORRY et al. (1995, 1996, 2003) veröffentlicht worden. Hier werden Vor- und Nachteile der Medien sowie ihrer Inhaltsstoffe diskutiert. Es findet eine ausführliche Beschreibung über verwendete Antibiotikazusätze und andere Inhibitoren in Anreicherungsmedien und Nährböden statt.

Eine andere Methode für die *Campylobacter*-Isolierung, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann, stellt die **Membranfiltermethode** dar. Zur Anwendung kommen unter anderem Cellulose-Triazetat-Filter, Cellulose-Nitrat-Filter oder Cellulose-Ester-Filter (0,45 µm bis 0,65 µm Porendurchmesser). Sie werden parallel mit Selektivnährböden oder nach Anreicherung eingesetzt. Entwicklungsarbeit und Untersuchungen leisteten hierbei die Gruppe DEKEYSER et al. (1972), MEGRAUD und GAVINET (1987), GOOSSENS et al. (1990), DE BOER und REITSMA (1991), SHANKER et al. (1991), KOSTER (1992), SCOTTER et al. (1993) sowie ENGBERG et al. (2000). Häufig wird von Autoren eine Porengröße von 0,65 µm bevorzugt (ATABAY und CORRY, 1996), da eine größere Ausbeute an *Campylobacter*-Keimen zu erwarten ist. Kompetitive Begleitkeimflora wird jedoch bei dieser Porengröße vermehrt anzutreffen sein (ASPINALL et al., 1996).

Auf dem Nährboden gewachsene präsumtive Kolonien werden zur weiteren Absicherung im hängenden Tropfen durch das **Ölimmersionsverfahren** bei 1000-facher Lupenvergrößerung

betrachtet. Es kann dann die für *Campylobacter* spp. typische korkenzieherartige, spiralförmige Bakterienmorphologie betrachtet werden. Auch ist dabei ihr charakteristischer, vorwärtsschießender Bewegungsablauf erkennbar, der nach Anreicherung in Flüssigkulturen noch ausgeprägter erscheint als bei *Campylobacter*-Keimen, die auf Nährboden gewachsen sind. Kokkoide Zellformen treten zumeist in älteren Kolonien auf, wobei ihre typische Motilität häufig eingeschränkt ausgeprägt ist. So ist es hilfreich in einem weiteren Präparat präsumtive Kolonien auf ihr Gram-negatives Anfärbeverhalten zu testen (GARCIA et al., 1983; ANONYMUS, 1995; NACHAMKIN et al., 2000; WANG und MURDOCH, 2004).

Aufgrund von undeutlich ausgeprägtem **biochemischen Verhalten** oder widersprüchlichen Angaben in den Angaben bei unterschiedlichen Autoren, ist die Differenzierung in die *Campylobacter*-Spezies schwierig (siehe Tabelle 7).

Nur wenige biochemische Unterscheidungskriterien zwischen *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* liegen vor, sodass ausschließlich der z. T. sehr subjektiv abzulesende **Hippurathydrolysetest** für die Differenzierung bei der Spezies entscheidend ist (HWANG und EDERER, 1975; HARVEY, 1980). Genotypische Methoden bieten hier eine valide Grundlage biochemische Ergebnisse verifizieren zu können (siehe Kapitel 2.3.3 und Kapitel 2.3.4), insbesondere dann, wenn Hippurathydrolyse-negative *Campylobacter*-Stämme isoliert wurden.

STEINBRUECKNER et al. (1999) begründen dies mit der Tatsache, dass in ihrer Isolatengruppe nur etwa 87 % aller *C. jejuni* Isolate Hippurathydrolyse-positiv sind. Auch TOTTEN et al. (1987) schlugen schon vor, dass der Hippurathydrolysetest kein alleiniges Entscheidungskriterium zur Differenzierung thermophiler *Campylobacter* spp. sein kann, wobei sie feststellten, dass etwa 20 % ihrer *Campylobacter jejuni* Isolate hippurat-negativ waren.

Ein weiter hilfreicher Differenzierungs-Test, der **Indoxylacetat-Hydrolysetest**, unterscheidet *Campylobacter lari* von den anderen thermophilen *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* und *Campylobacter upsaliensis* (HODGE et al., 1990; POPOVIC-UROIC et al., 1990).

Die variable **Sensitivität** gegenüber dem Antibiotikum Nalidixinsäure stellt ebenfalls ein häufiges Problem dar, thermophile *Campylobacter* spp. eindeutig differenzieren zu können. So ist es schwierig *Campylobacter lari* von hippurat-variablen *Campylobacter jejuni*, aufgrund zunehmender Flourchinolonresistenz in einigen Stämmen, voneinander zu differenzieren (SMITH et al., 1999; BARTELT et al., 2003; GE et al., 2003). Kommerziell erhältliche Testkits zur biochemischen Differenzierung sind für die Routinediagnose im Labor sinnvoll (Api<sup>®</sup>Campy, Fa. bioMérieux; *Campylobacter* Identifizierungs Kit, Fa. Mast Diagnostica).

**Tabelle 7:** Differenzierungsmerkmale des Genus *Campylobacter* (modifiziert nach STANLEY et al., 1992; VANDAMME und GOOSSENS, 1992; ETOH et al., 1993; CORRY et al., 1995; VANDAMME, 2000; GARRITY et al., 2002)

Spezies	Biochemische Reaktion						Wachstum					Sensibilität		
	Katalase	Oxidase	Nitritreduktion	Urease	H <sub>2</sub> S Produktion <sup>d</sup>	Hippurathydrolyse	Indoxylacetat-Hydrolyse	H <sub>2</sub> Bedarf <sup>b</sup>	25 °C	42 °C	Kochsalztoleranz (4 % NaCl)	Glycoltoleranz (1% Glycin)	Nalidixinsäure	Cephalothin
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	S	R
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	+	+	-	-	(+)	+	+	-	V <sup>c</sup>	-	V	S	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	S	S	R
<i>C. lari</i>	+	+	+	(-)	-	-	-	(-)	+	-	+	V	V	R
<i>C. upsaliensis</i>	(+)	+	+	-	-	-	+	-	(+)	-	(+)	S	S	V
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	V	V	S
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	+	+	-	-	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-	+	R	R	S
<i>C. sputorum</i> ssp. <i>sputorum</i>	-	+	+	-	+ <sup>c</sup>	-	-	-	+	+	+	S <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	S
<i>C. sputorum</i> ssp. <i>bubulus</i>	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+ <sup>c</sup>	+	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	S
<i>C. gracilis</i> <sup>e</sup>	V	-	+	-	+	-	k.A.	+	-	-	+	S	S	R
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	V	V <sup>a</sup>	V <sup>a</sup>	S
<i>C. concisus</i>	-	+	(+)	-	(+)	-	(-)	+	-	-	V	(R)	(R)	(S)
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	(+)	(-)	(+)	+	-	-	+	R	R	S
<i>C. rectus</i>	(-)	+	+	-	V	-	+	+	-	-	+	(R)	(R)	S
<i>C. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	V	S	S	S
<i>C. showae</i>	+	+	+	-	(+)	-	(+)	+	-	-	V	V	V	S
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	k.A.	V	-	+	R	R	(S)
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	+	+	+	+	+	-	-	k.A.	+	-	V	R	R	S
<i>C. hominis</i>				k.A.					k.A.				k.A.	k.A.
<i>C. lari</i>				k.A.					k.A.				k.A.	k.A.

+, positiv; (+) meisten Stämme positiv; -, negativ; (-) meisten Stämme negativ; S, sensibel; (S) meisten Stämme sensibel; R, resistent; (R) meisten Stämme resistent; V, variabel; <sup>a</sup> 80 % variabel; <sup>b</sup> für mikroaerobes Wachstum; <sup>c</sup> variabel nach Hensyl (1994); <sup>d</sup> unsensibles Medium (TSI – triple sugar iron, cysteinhaltiges Medium mit Bleiacetatstreifen); <sup>e</sup> unbeweglich, oxidase-negativ, feine Kolonien auf Blutagar; k. A., keine Angaben

Insofern sich diese Testsysteme auf die oben genannten Reaktionen berufen, ist ihre Aussagekraft und Zuverlässigkeit umstritten und bieten nach HUYSMANS et al. (1995) keinerlei Vorteile gegenüber herkömmlichen biochemischen Tests. Auch REINA et al. (1995) stützen diese Erkenntnis, und verweisen noch einmal auf den für die Identifikation von Nalidixinsäure resistenten *Campylobacter coli* wichtigen IAH-Test.

### 2.4.3 Immunologische Methoden – Serotypisierung

Phänotypische Methoden, die die Identifikation gewonnener Isolate in kurzer Zeit realisieren können, sind beispielsweise Tests, die sich immunologische Prinzipien zu Nutze machen (HAZELEGER und BEUMER, 1999).

Anders als bei den zuvor geschilderten klassisch-kulturellen phänotypischen Methoden, können Isolate durch serologische Verfahren über antigenspezifische, mono- bzw. polyklonale Antikörper differenziert werden (NACHAMKIN et al., 2000).

So wurde ein System entwickelt, das über eine passive Hämagglutination hitzestabile Oberflächenantigene von *Campylobacter* anspricht. Neben diesem so genannten Penner/HS-System entstand ein Lior/HL-System, welches sich die hitzelabilen *Campylobacter*-Oberflächenantigene zunutze macht (PENNER und HENNESSY, 1980; LIOR et al., 1982). Ein neueres, stabileres Testsystem, das so genannte Laboratory-of-Enteric-Pathogens-System, basiert auf der direkten Agglutination (FROST et al., 1998).

Anwendungsgebiet dieser Methoden ist in erster Linie die Epidemiologie/Infektiologie (WICHELHAUS et al., 2000). So werden hiermit unter anderem Fragestellungen der Ähnlichkeiten verschiedener *Campylobacter*-Stämme zu beantworten versucht. Ein aktuelles Thema stellt dabei die Resistenzbildung pathogener Keime dar, bei der die Klärung der Herkunft resistenter Keime im Mittelpunkt steht. KRAMER et al. (2000) verglichen *Campylobacter*-Isolate menschlichen sowie tierischen Ursprungs miteinander. Dabei wiesen eine Gruppe der Geflügel und Lammisolate mit den humanen Isolaten identische Subtypen auf.

Um *Campylobacter*-Keime eindeutig als Infektionsquelle identifizieren zu können, bedarf es nicht nur eines Nachweissystems. Entweder lassen sich zurzeit nicht alle Stämme typisieren oder eine konstante, reproduzierbare Typisierung wird aufgrund der hohen Antigenvariabilität, bedingt durch die geringe Klonalität des Genus, scheitern (WASSENAAR, 2000; SUERBAUM et al., 2001; DINGLE et al., 2002; MCKAY et al., 2001; MEINERSMANN et al., 2002; WIELER und LATURNUS, 2003). So ist die Kombination mit einer diskriminatorisch höherwertigen Methode sinnvoll.

NIELSON et al. (2000) verglichen *Campylobacter*-Isolate des Menschen mit denen vom Geflügel und anderen landwirtschaftlichen Nutztieren unter zu Hilfenahme phänotypischer und genotypischer Methoden. Erst durch die Kombination mindestens zweier Methoden (phänotypisch/genotypisch oder genotypisch/genotypisch) kann dann eine genauere Differenzierung des Isolats und so eine mögliche Klärung der Herkunft des Isolats, ermöglicht werden (WASSENAAR und NEWELL, 2000; MÜLLER et al., 2004).

Die bemerkenswerte Antigen Diversität thermophiler *Campylobacter* spp. behinderte so die Entwicklung vieler immunologisch basierender Nachweismethoden (BLASER et al., 1983a; LOGAN und TRUST, 1983).

Nachteile der serologischen Differenzierung stellen die in hoher Zahl selbst herzustellenden Antiseren sowie das im Vergleich zu anderen Methoden mäßige Differenzierungspotential/Diskriminierungspotential dar (WASSENAAR und NEWELL, 2000; WICHELHAUS et al., 2000; DESAI et al., 2001).

Ein anderes, auf Basis der Immunologie beruhendes System, stellt der Enzym Immunoassay dar. Eine Darstellung der Grundprinzipien und sowie eine Einteilungen der verschiedenen Arten von Assays geben WYATT (1992), HARTMAN et al. (1992) und SHARMA (1999). Immunoassays, die für das Einsatzgebiet der Lebensmittelmikrobiologie und für den Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebensmittel-liefernden Tieren als auch in Lebensmittel bestimmt sind, wurden von zahlreichen Autoren beschrieben, untereinander verglichen und getestet. Sie geben nicht nur Hilfestellungen zum Eigenbau spezifischer Assays, sondern diskutieren zukünftige Einsatzgebiete dieser Testsysteme innerhalb der Lebensmittelmikrobiologie (WYATT, 1992; BLACKBURN 1994; PATEL, 1994; BECKER et al., 1994 und 1998, 1998a, 1998b; DE BOER und BEUMER, 1999; HOORFAR et al., 1999; WAGENAAR et al., 2001; MORGAN et al., 2001; BORCK et al., 2002; DEDISTE et al., 2001, 2003).

Ein in der Lebensmittelmikrobiologie häufig verwendetes Prinzip ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Die Abbildung 6 erläutert schematisch den Aufbau und das Prinzip am Beispiel des *Campylobacter*-Nachweises. Wenige Studien haben gemeinsame Antigene der thermophilen *Campylobacter* identifiziert, welche als Zielepitope auf Antikörpern in Enzymimmunoassays fungieren könnten (MILLS et al., 1986; TAYLOR und CHANG, 1987; DUBREUIL et al., 1990). Die Zelloberflächen-Antigene von *Campylobacter* spp. sind komplex und wenige wurden detailliert charakterisiert (DUNN et al., 1987; NEWELL und NACHAMKIN, 1992). Immunologische Kreuzreaktionen unter *Campylobacter*-Stämmen sind beschrieben worden (BLASER et al., 1983 und 1984; LOGAN und TRUST, 1983, 1986).

### miniVIDAS® CAM-Assay

Das Prinzip des ELISA macht sich der miniVIDAS® CAM-Assay (VITEK IMMUNO DIAGNOSTIK ASSAY, Fa. bioMérieux) zunutze, indem er in Proben *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* und *Campylobacter jejuni* nach einem Anreicherungsschritt über polyklonale Antikörper, die in einem spritzenartig geformten Festphasenrezeptor (SPR) arretiert sind, detektiert (siehe Kapitel 3). Die Detektion läuft in einem automatisierten System ab. Abzüglich der Anreicherungszeit können thermophile *Campylobacter*-Antigene nach circa 70 Minuten colorimetrisch (ELFA, Enzyme-linked Fluoreszenz Assay) nachgewiesen werden (Abbildung 4 und 5). Screening Ergebnisse liegen schon nach insgesamt 48 h vor. Eine kulturelle Bestätigung positiver Ergebnisse des Assays wird seitens des Herstellers gefordert.



**Abbildung 4:** miniVIDAS® System (links) mit CAM-Reagenzienriegel und Festphasenrezeptor (rechts) (Photoquelle: siehe Literaturverzeichnis)

Auch andere lebensmittelhygienisch relevante Antigene pathogener Erreger sind über das miniVIDAS® Prinzip nachweisbar (*Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*). Forschungsleistungen und kollaborative Vergleichstudien erbrachten diesbezüglich BLACKBURN et al. (1994), DE MEDICI et al. (1996), CURIALE et al. (1997), KEITH (1997), BECKER et al. (1994, 1998, 1998a, 1998b), VERNOSY-ROZAND (1998, 1998a), VAN DER ZEE (1999), WAGNER et al. (1999), GANGAR et al. (2000), KERDAHI und ISTAFANOS (2000), VAZ-VELHO et al. (2000), BRUNNER und BÜLTE (2002), LEPPER et al. (2002a, 2002b, 2002c) und YEH et al. (2002).

Viele dieser Untersuchungen beziehen sich auf *Salmonella* spp. und *E. coli*. Nur einige wenige Autoren befassen sich in jüngster Zeit mit dem Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. durch das miniVIDAS® System (HOORFAR, 1999; JACOBS-

REITSMA, 1999; BORCK et al., 2001a und 2002; NESBAKKEN et al., 2002; PAULSEN et al., 2002).

**Vergleichende Untersuchungen** des miniVIDAS® CAM-Assays gegenüber anderen ELISAs oder klassisch, kulturellen Methoden sind von einigen wenigen Autoren in der Literatur beschrieben.

KRADOLFER und BOUCHET (1998) ermittelten eine Sensitivität des miniVIDAS® CAM-Assays von 98 % gegenüber 93 % der von ihnen verwendeten Referenzmethode. Dabei wurden 10 g rohes Geflügelprodukt (n = 166) in 90 ml Preston Bouillon angereichert. Die Isolation fand auf Campyloset®-Agar statt. So konnten durch den miniVIDAS® Assay mehr *Campylobacter*-positive Proben als durch die klassische Methode nachgewiesen werden. Beide Methoden besaßen eine Spezifität von 100%.

Das automatisierte System ist schneller, weniger arbeitsintensiv und zuverlässiger als die Referenzmethode (KRADOLFER und BOUCHET, 1998; HOORFAR et al., 1999; BORCK et al., 2002; JACOBS-REITSMA, 2003; BATTISTA et al., persönliche Mitteilung).

Ebenfalls gute Übereinstimmungen zwischen einer kulturellen Methode bei gleichzeitigem Einsatz des Membranfiltersystems (Porengröße 0,65 µm) und dem miniVIDAS® Assay erzielten ELMER-ENGLHARD et al. (1998). Auch hier wurde als Anreicherung die Preston-Bouillon verwendet. Isoliert wurde auf Selektivnährboden nach Skirrow. Die Filtration der bebrüteten Anreicherung drängte Begleitkeime weitgehend zurück.

HOORFAR et al. (1999) führten Vergleichsuntersuchungen an zwei automatisierten Enzymimmunoassays durch und stellten beim Nachweis von *Campylobacter* spp. aus Kotproben eine hohe Sensitivität (100 %, n = 7) des miniVIDAS® Systems fest. Aufgrund falsch-positiver Reaktionen erlangten sie in Versuchen nur eine Spezifität von 71 % (n = 14). Das miniVIDAS® System erwies sich in diesen Untersuchungen als einfach durchzuführende Methode und besitzt ein großes Potential als automatisierte Screeningmethode bei hohem Probendurchlauf im Labor eingesetzt zu werden.

Die Vorteile eines solchen Systems beschrieben ebenso JACOBS-REITSMA et al. (1999, 2003). Sie führten den Nachweis von *Campylobacter* spp. in frischer Broilerhaut und Geflügelbrust-Filet. Ein Einsatz dieser Methode in Monitoring Programmen mit großen Probenvolumina auf Schlachthaus-Ebene scheint ihnen ebenso sinnvoll. Die Ergebnisse ihrer Studien verdeutlichen, dass frisches Geflügelprobenmaterial eine Anreicherungszeit von 48 h benötigt.

In die von JACOBS-REITSMA (1999) durchgeführten Vergleichsuntersuchung, bei der das miniVIDAS<sup>®</sup> System mit der Methode nach ISO 10272 verglichen wurde, konnte dem automatisierten System eine hohe relative Sensitivität (92 %), Spezifität (91 %) und Accuracy (92 %) nachgewiesen werden. Auch ist das System für Geflügelkot einsetzbar. Es konnte eine zufrieden stellende Sensitivität (83 %) bei einer nur niedrigen Spezifität (72 %) bestimmt werden. Dies konnte von BORCK et al. (2002) ebenfalls bestätigt werden. Sie erzielten jedoch eine höhere Sensitivität (94 %) und Spezifität (97 %) bei den Kotproben. Verwendung fanden hier neben Putenkot auch Fleisch und Nackenhaut von der Pute. Sie wiesen insbesondere auf die Abhängigkeit des Ergebnisses von der Probenmatrix hin. Hohe Sensitivitäten konnten demnach in Matrices mit hohen *Campylobacter*-Konzentrationen erreicht werden. Dies ist bei Kotproben wahrscheinlicher als bei den anderen verwendeten Probenmaterialien.

TRIGO et al. (2002) zeigten auf, dass beim miniVIDAS<sup>®</sup> Verfahren die Anzahl der positiven Ergebnisse beim Nachweis von *Campylobacter* spp. mindestens ebenso hoch wie bei der Referenzmethode (ISO 10272) war. Sie konnten eine hohe Spezifität (98,7 %) und Sensitivität (100 %) ermitteln.

Auch PAULSEN et al. (2002) setzten das VIDAS-System zum *Campylobacter*-Nachweis in gefrorenem und gekühltem Fleisch (Rind, Schwein) sowie Innereien (Schwein) ein. Dabei konnten in sechs der gefrorenen Proben (n = 102) sowohl kulturell als auch mit dem ELFA *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden.

Zwar sind Versuche beschrieben, die mit *Campylobacter* spp. dotiertem Probenmaterial (BORCK et al., 2002) arbeiten, Angaben zur Nachweisgrenze des miniVIDAS<sup>®</sup> *Campylobacter* Assays oder der miniVIDAS<sup>®</sup> Methode inklusive des Anreicherungsschrittes sind der Literatur jedoch nicht zu entnehmen. Immunologische Methoden besitzen nach DE BOER und BEUMER (1999) und SWAMINATHAN und FENG (1994) eine Nachweisgrenze von 10<sup>5</sup> KbE/ml bzw. g. Andere Autoren gehen von 10<sup>3-6</sup> KbE/ml bzw. g aus. In Tabelle 8 sind einige ausgewählte immunologische und molekularbiologische Methoden mit ihrer ermittelten Nachweisgrenze für *Campylobacter* spp. gelistet.

# VIDAS Campylobacter Assay

Antigennachweis in circa 70 Minuten

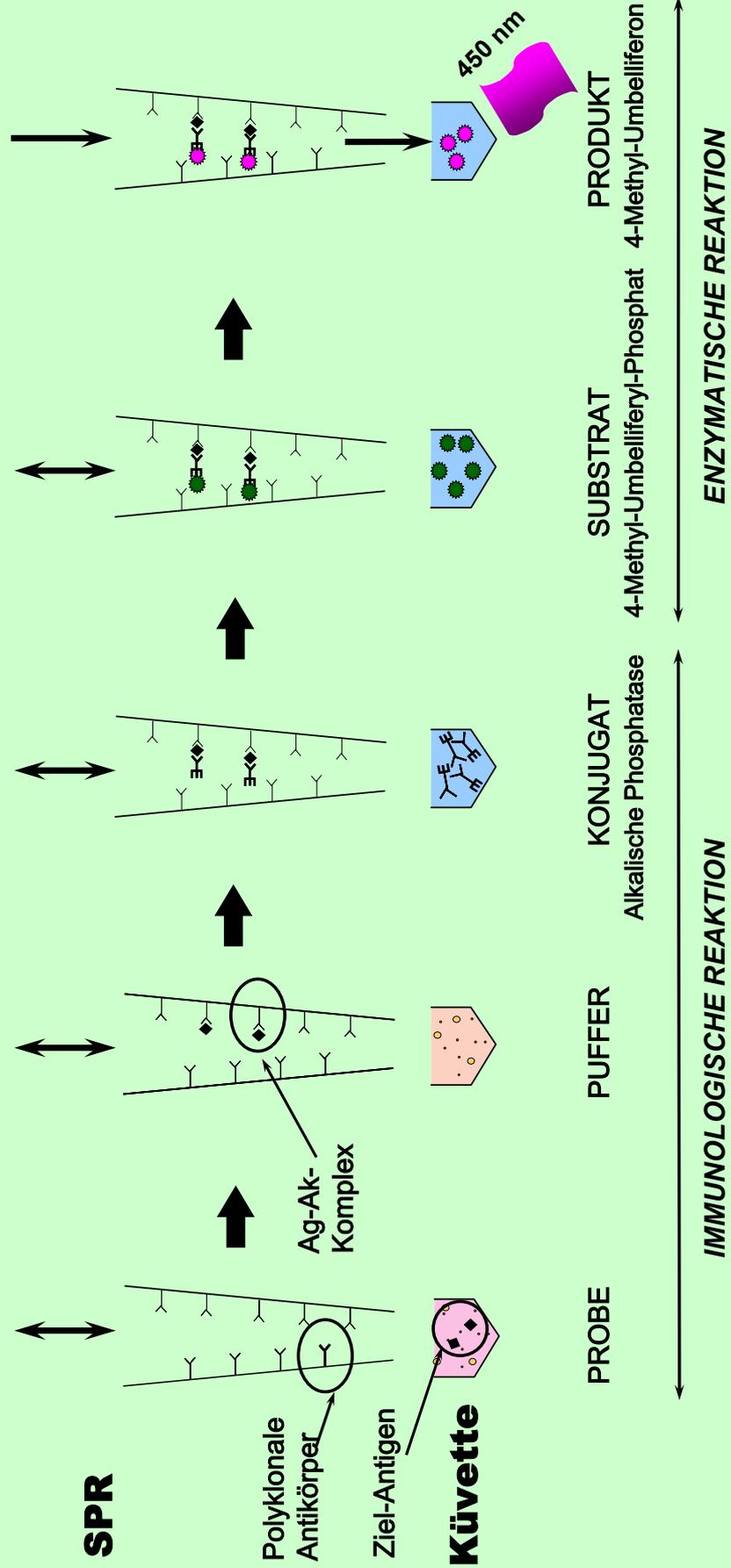
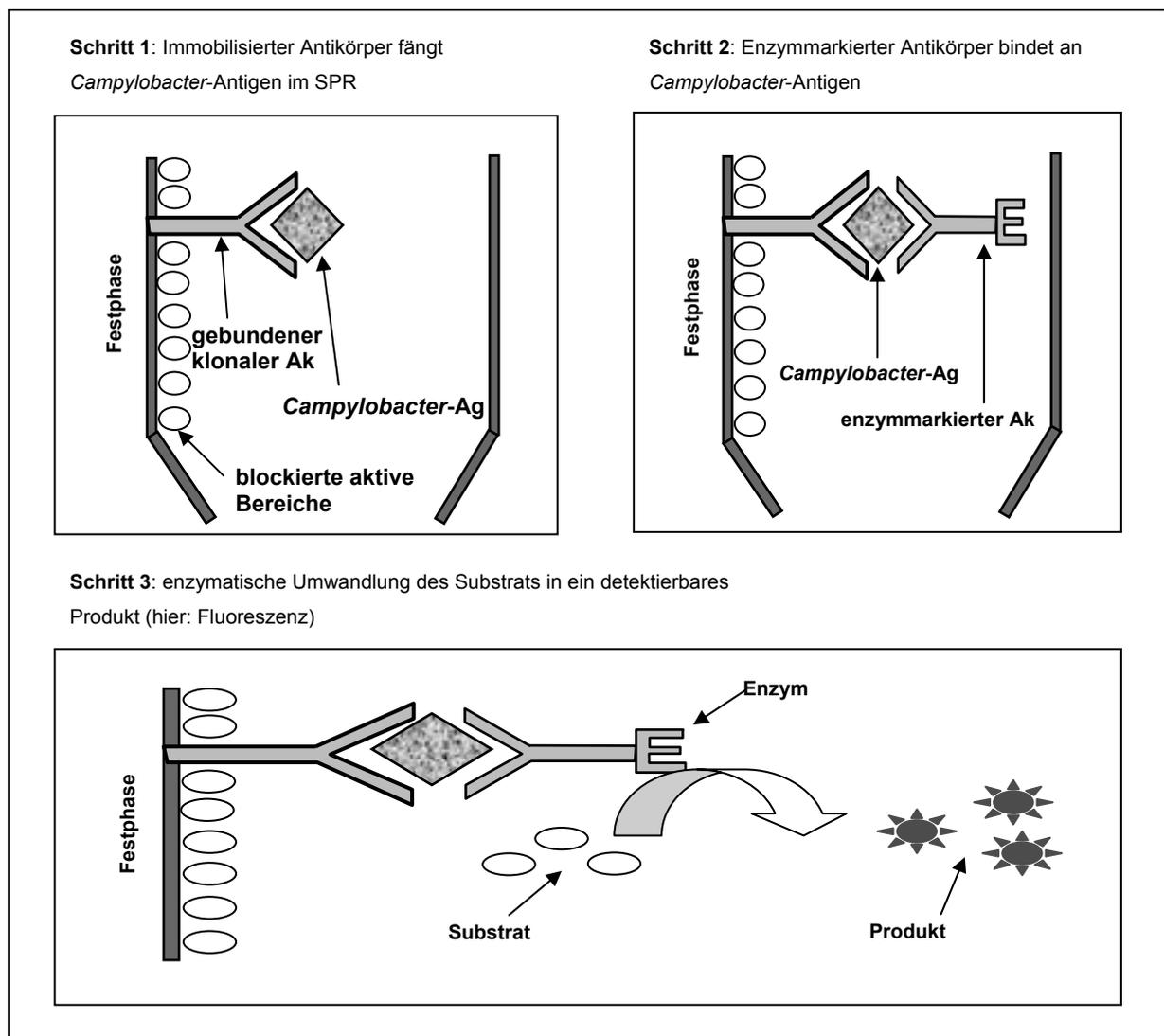


Abbildung 5: miniVIDAS® Campylobacter Assay (ELFA) im Festphasenrezeptor (SPR), nm: Nanometer (modifiziert, Fa. BioMérieux)

### Singlepath *Campylobacter*<sup>®</sup> Lateral Flow Assay

Ebenfalls auf dem immunologischen Prinzip basiert der kommerziell angebotene Singlepath *Campylobacter*<sup>®</sup> Lateral Flow Assay (Fa. Merck). Dieser Test nutzt das immunochromatische Prinzip. Dabei fließen hochspezifische, Gold-gelabelte Antikörper im Komplex mit *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* Antigenen über eine Nitrocellulose-Membran. An einem auf der Membran immobilisierten hochspezifischen Fang-Antikörper binden die Komplexe, wobei abschließend eine Farbreaktion entsteht (GLISA – Gold-Labeled Immunosorbent Assay).



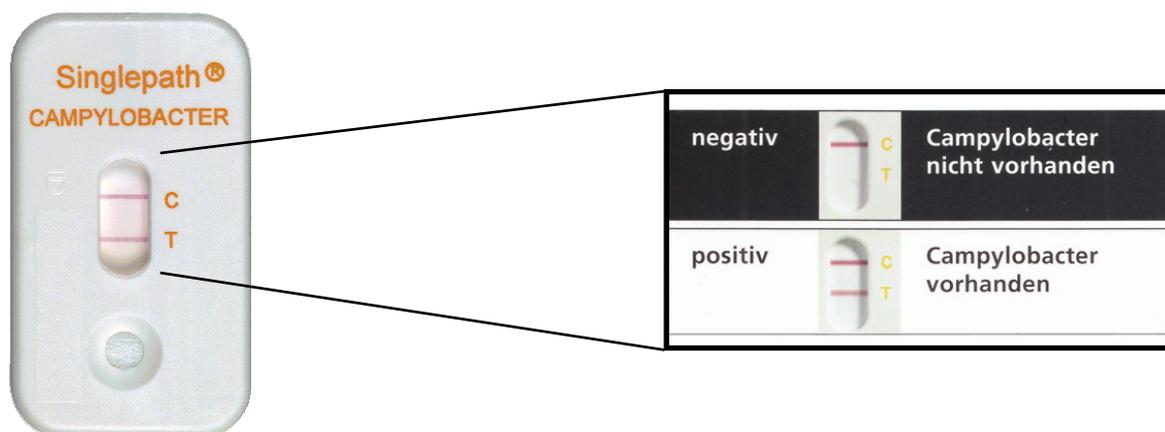
**Abbildung 6:** Prinzip eines Sandwich-ELISA (Ak: Antikörper, Ag: Antigen, SPR: Festphasenzeptror)

Nach einer 48 Stunden Anreicherung liegt das visuell bestimmte Ergebnis in 20 Minuten vor (Abbildung 7). Die Nachweisgrenze liegt Stamm-abhängig bei  $10^5$  bis  $10^6$  KbE/ml Anreicherungsbouillon. Während für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* ein unteres Detektionslimit ab ca.  $1 \times 10^5$  KbE/ml festgestellt wurde, lag die untere Nachweisgrenze für die anderen *Campylobacter*-Spezies bei ca.  $3 \times 10^7$  KbE/ml (BUBERT et al., 2004).

Unter Verwendung von Reinkulturen wird eine Sensitivität und Spezifität zur parallel verwendeten kulturellen Methode (ISO 10272) von BUBERT et al. (2004) mit jeweils 100 % angegeben. In artifiziell kontaminiertem Geflügelhackfleisch gelang ihnen der Nachweis von 1 bis 11 KbE/25 g Lebensmittel nach Anreicherung.

Sie sehen diesen Test für die Routineuntersuchung von Lebensmittelproben als geeignet an und stellten bei vergleichenden Studien eine Übereinstimmung mit dem miniVIDAS® System von 100 % fest (n = 16).

In Tabelle 8 ist eine Auswahl an phänotypischen Methoden dargestellt, die dem Nachweis von *Campylobacter* spp. aus verschiedenen Probenmaterialien dienen. Anhand von Dotierungsversuchen wurde die *Campylobacter*-Konzentration ermittelt, die in einer Matrix, z. B. im Lebensmittel, vorhanden sein muß, um zu einem positiven Untersuchungsergebnis zu führen.



**Abbildung 7:** Singlepath *Campylobacter*® Lateral Flow Assay (Fa. Merck) und Darstellung des richtig-positiven und richtig-negativen Ergebnisses

So ist in der Tabelle 8 die Nachweisgrenze angegeben, die systemabhängig bzw. methodenabhängig schwankt. DOCHERTY et al. (1996) geben zudem keine geräteabhängige Nachweisgrenze an, sondern die vor der Anreicherung vorliegende minimale

Keimkonzentration, bei dem das System nach Anreicherung noch ein positives Ergebnis misst.

**Tabelle 8:** Nachweisgrenzen verschiedener immunologischer Systeme zum Nachweis von *Campylobacter* spp. aus dotierten Proben

Nachweissystem		Dotierte Probenart	Nachweisgrenze [KbE/ml bzw. g]	Quelle
Immunologische Methode	ProSpecT® Microplate Assay	Kotsuspension	$3 \times 10^6$	ENDTZ et al., 2000
		Stuhlsuspension	$3 \times 10^6$ bis $3 \times 10^7$	HINDIYEH et al., 2000
	PCR-ELISA	Geflügelspülprobe	$4 \times 10^1$ (40 Zyklen)	HONG et al., 2003
	Immunomagnetic beads (IMB)	Geflügelhackfleisch	$1 \times 10^4$	YU et al., 2001
		Suspension	$1 \times 10^{3-4}$	
Magnetic Immuno-PCR (MIPA)	Geflügelprodukte	420 (mit 18 h A.) 42 (mit 24 h A.) 4,2 (mit 35 h A.)	DOCHERTY et al., 1996	

A.: Anreicherung

Ebenfalls niedrige Nachweisgrenzen sind bei der Kombination von immunologischen und molekularbiologischen Methoden zu erwarten (HONG et al., 2003). SAILS et al. (2001) stellten bei ihrer PCR-ELISA eine 10 bis 100-fache Sensitivitätssteigerung gegenüber der gelbasierenden PCR unter Verwendung der gleichen Primer fest.

#### 2.4.4 Genotypische Methoden

Genotypische Methoden basieren auf dem Nachweis chromosomaler Unterschiede im Erbgut.

Eine Vielzahl von genotypischen Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp. sind derzeit in Gebrauch und haben sich mehr oder weniger stark etabliert (GIESENDORF et al., 1992; OYOFO et al., 1992; EYERS et al., 1993; VAN CAMP et al., 1993; WEGMÜLLER et al., 1993; LINTON et al., 1996; HARMON et al., 1997; OYARZABAL et al., 1997; BANG et al., 2001; GRENNAN et al., 2001; AQUINO et al., 2002; BOLTON et al., 2002; CLOAK und FRATAMICO, 2002; SAILS et al., 2002). Je nach Möglichkeiten des Labors und Fragestellung werden Methoden unterschiedlichen diskriminierenden Potentials verwendet (Tabelle 9).

#### Polymerase-Kettenreaktion

Eine einfach durchzuführende Methode mit ausreichender Differenzierung des Zielkeims stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar.

Ringversuche für die Validierung neuer molekularbiologischer Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp. wurden durchgeführt (LÜBECK et al., 2003; www.pcr.dk; LUND et al., 2003)

Der Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* (OYOFO et al., 1992; WEGMÜLLER et al., 1993), zum Teil auch *Campylobacter lari* und *Campylobacter upsaliensis* (VAN DOORN et al., 1997) in einem PCR-System aus zwei bzw. drei Primern ist möglich (MÄDE und STARK, 2000). Eine Differenzierung zwischen den thermophilen *Campylobacter* spp. durch die Anwendung der Multiplex-PCR basierend auf das Lipid A Gene lpxA ist beispielsweise KLENA et al. (2004) gelungen.

Da zunehmend genotypische Methoden in der Mikrobiologie verstärkt zum Einsatz kommen (SWAMINATHAN und FENG, 1994), verglichen KNOLL-SAUER et al. (2002) miniVIDAS® mit der PCR Methode nach OYOFO et al. (1992). Zwar wurden gute Ergebnisse erzielt, jedoch betonen die Autoren, dass sich die auftretenden Diskrepanzen beider Methoden womöglich in der Spezifität der molekularbiologischen Methode erklären lassen. Ein Nachweis von *Campylobacter lari* ist demnach mit dieser PCR und dem Primerpaar pg3/pg50 nicht möglich, wohl aber mit dem miniVIDAS® Assay.

**Tabelle 9:** Beispiele genotypischer Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp. und ihre geschätzte Praktikabilität/Durchführbarkeit (mod. n. WASSENAAR, 2000)

Methoden	Differenzierungspotential	Durchführbarkeit	Quelle
PCR	hoch	einfach	OYOFO et al., 1992 DENIS et al., 1999
PCR/RFLP	hoch	einfach	STEINHAUSEROVA et al., 2001
RFLP	hoch	einfach	VAN DER PLAS et al., 1994
RAPD-PCR	hoch	einfach	ENDTZ et al., 2000a
PFGE	hoch	aufwendig	ON, 1998; DE BOER, 2000
AFLP	hoch	schwierig	HÄNNINEN et al., 2001 WAGENAAR et al., 2001a
Microarray	hoch	aufwendig, schwierig	DORRELL et al., 2001

Auch kommerziell erhältliche Kit-Systeme für den molekularbiologischen Nachweis sind vorhanden. Über die genaue Zusammensetzung solcher Systeme, z. B. die verwendeten Primer, wird oft keine oder nur unzureichende Auskunft der Firmen erteilt (BAX® System, DuPont Qualicon, ENGLER et al., 2001; ENGLER und FEDORKA-CRAY, 2002; Bactotype *Campylobacter*, Biotype® AG, Dresden). Eine Auswahl an Primersystemen ergibt sich aus der Tabelle 10. HILL (1996) stellt eine ausführliche Übersicht von PCR Methoden und ihre Primersysteme dar, die für den Nachweis und für die Identifikation von Bakterien, Viren und Parasiten entwickelt wurden.

Eine vorläufig Methode für den *Campylobacter*-Nachweis im Sinne des § 35 LMBG ist beschrieben worden (ANONYMUS, 2000) und orientiert sich an den Arbeitsergebnissen von OYOFO et al. (1992).

Für den Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. in Milch erwies sich das System nach OYOFO et al. (1992) mit dem pg3/pg50-Primersystem (Flagellin-Gen) als gut geeignet. Das genannte Primersystem weist eine gleiche Sensitivität wie der kulturelle *Campylobacter*-Nachweis auf. Es besitzt zum Screening das Potential einen großen Probendurchsatz zu gewährleisten (MÄDE und STARK, 2000) und wird von mehreren Arbeitsgruppen eingesetzt (OYOFO et al., 1992; MANZANO et al., 1995; CHUMA et al., 1997; LINTON, 1997; BRECHTEL et al., 2002; HUBER et al., 2004).

Die Gruppe BRECHTEL et al. (2002) untersuchte 200 Produkte eines Tiefkühlkostbetriebes hinsichtlich des Vorkommens von thermotoleranten *Campylobacter* mit Hilfe der PCR nach OYOFO. Parallel wurde die kulturelle Methode nach ISO 10272 (Anreicherung in 10 g Probenmaterial) eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten auf, dass die *Campylobacter*-Kontamination nur bei der Produktgruppe „Geflügelfleisch, roh“ (Isolationsrate 15,7%) und bei den Produkten „Hähnchenbrustfilet, unpaniert“ sowie „Ganze Schenkel vom Hähnchen“ eine Rolle spielten. Die molekularbiologischen Untersuchungsergebnisse stimmten mit den Ergebnissen der kulturellen Methode zu 100 % überein.

Auch HUBER et al. (2004) setzten dieses Primersystem nach OYOFO et al. (1992) ein und führten parallel den *Campylobacter*-Nachweis aus Lebensmittelprodukten vom Geflügel unter Verwendung des miniVIDAS® Systems. Über 48 h in Preston-Bouillon angereichertes Lebensmittelhomogenat wurde nach positivem PCR/VIDAS-Screening über eine Filtrationsmethode (0,65 µm Porendurchmesser) kulturell bestätigt. 324 Proben ( $n_{\text{gesamt}} = 337$ ) stimmten im molekularbiologischen und immunologischen Ergebnis überein. 10 Proben waren nur immunologisch positiv, wobei sich diese Differenz zum Teil methodisch erklären lässt, da das miniVIDAS® System, im Gegensatz zum Primersystem nach OYOFO, *Campylobacter lari* nachzuweisen vermag. 67,5 % der Isolate erwiesen sich als *Campylobacter jejuni*, 32,5 % konnten als *Campylobacter coli* identifiziert werden.

Vergleichende Untersuchungen zur PCR nach OYOFO et al. (1992) führten ebenso OPFER et al. (2001) durch. Dabei wurde dieses System mit einer seminested PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993) verglichen. Parallel wurde als Referenzmethode die kulturelle Methode nach ISO 10272 durchgeführt. Die Probenmatrix stellte frisches und tiefgefrorenes Geflügelfleisch dar. OPFER et al. (2001) ermittelten für die Methode nach OYOFO et al. (1992) eine Sensitivität von 98 %. Insbesondere das Vorhandensein mehrerer falsch-positiver Probenergebnisse

führte zu einer Spezifität von 88 %. Auch ein falsch-negatives Ergebnis konnte festgestellt werden. Sie betonten, dass neben Positiv- und Negativkontrollen die Verifikation der Amplifikate, z. B. durch eine Hybridisierung, nötig ist, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Eine Southernblot-Hybridisierung wurde von ihnen jedoch nicht durchgeführt.

MÄDE und STARK (2000) verglichen verschiedene PCR Systeme untereinander, wobei das pg3/pg50-Primersystem nach OYOFO et al. (1992) zu den sensitivsten zählt. Die Sensitivität entsprach der kulturellen Methode.

Die Differenzierung zwischen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* auf klassischem Weg über die Hippurathydrolyse wird durch verzögerte Hippuratspaltung einiger *Campylobacter jejuni* Stämme erschwert (siehe Kapitel 2.3.1). Darüber hinaus treten hippuratnegative Stämme auf, die sich durch Sequenzanalyse im Flagellin-Gen nach der PCR mit dem Primerpaar pg3/pg50 eindeutig als *Campylobacter jejuni* klassifizieren lassen (MÄDE und STARK, 2000).

Eine Differenzierung kann auch schon durch die PCR erfolgen (VAN DOORN et al., 1997).

Die Möglichkeit zwischen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* zu differenzieren wird zunehmend wichtiger, da eine Erythromycin-basierende Behandlung bei *Campylobacter coli* nicht adäquat ist und diese Spezies zunehmend resistenter gegen dieses Antibiotikum wird (GRENNAN et al., 2001).

Da durch die PCR auch tote oder sich im VBNC-Status befindliche Keime erfasst werden, kann derzeit auf eine kulturelle Bestätigung, insbesondere bei amtlicher Untersuchung, nicht verzichtet werden. Der Einsatz molekularbiologischer Methodik ist jedoch auch bei negativem kulturellem Ergebnis sinnvoll, da sie eine Verkürzung der Untersuchungszeit bei gleichzeitig hoher Sensitivität erbringt. Der Hygienestatus eines beprobten Betriebes kann zügig festgestellt und Gegenmaßnahmen im Sinne des § 3 der Lebensmittelhygiene-Verordnung realisiert werden. Die Kontamination solcher Betriebe steht außer Zweifel, sodass mit Nachproben eine kulturelle Bestätigung gelingen kann (KLINGSBICHEL und JENEWEIN, 2000; MÄDE und STARK, 2000).

Durch die Einbindung einer Anreicherung, wie nach der ISO 10272 vorgeschrieben, können die in Lebensmitteln meist sehr niedrigen Zahlen von *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden und molekularbiologisch positive Proben kulturell nachuntersucht werden. Eventuell vorhandene tote Keime werden dabei verdünnt (GIESENDORF et al., 1992). Hiernach sollte dem molekularbiologischen Nachweis von Keimen in Lebensmitteln oder Umweltproben eine kulturelle Anreicherung der nachzuweisenden Erreger vorausgehen.

**Tabelle 10:** Primersysteme zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter* (nach MÄDE und STARK, 2000; HILL, 1996)

Zielgen	Primerbezeichnung	Quelle
<i>fla</i> Flagellin-Gen	pg3, pg50 ( <i>flaA</i> -Gen) CA1, CA2 CF02, CF03, CF04	OYOFO et al., 1992 RASMUSSEN et al., 1996 WEGMÜLLER et al., 1993
16s-rRNA-Gen	6-1, 18-1	VAN CAMP et al., 1993
	CCCJ609F, CCCJ1442R	LINTON et al., 1997
23s-rRNA-Gen	k. A.	IRIARTE und Owen, 1996
<i>ceuE</i> Siderophoren-Gen	COL1, COL2, JET1, JET2	GONZALEZ et al., 1997
<i>mapA</i>	MDmapA2/A1	STUCKI et al., 1995
GTPase-Gen	GTP 1.1, GTP 2.1, GTP 2.2	VAN DOORN et al., 1997

k. A.: keine Angaben

Ebenso sollten Amplifikate je nach Fragestellung entsprechend der DIN 10134 verifiziert werden. Bei der Methode nach OYOFO et al. (1992) sind digoxigenmarkierte und biotinylierte Sonden beschrieben. Die Verifikation geschieht mittels Blotting der Amplifikate, Hybridisierung der Sonden und eines abschließenden Farbnachweises (ANONYMUS, 2000). Falls nur die PCR als Nachweissystem genutzt wird, sollte ein weiteres Primersystem die Ergebnisse absichern (persönliche Mitteilung).

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. ist sowohl aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes (GIESENDORF et al., 1992; WEGMÜLLER et al., 1993; WAAGE et al., 1999; THUNBERG et al., 2000; WALLER und OGATA, 2000; WINTERS und SLAVIK, 2000; GRENNAN et al., 2001; MORENO et al., 2001; SAILS et al., 2001, 2003) als auch aus Fäzes (WAEGEL und NACHAMKIN, 1996; STEINBRUECKNER et al., 1999; VANNIASINKAM et al., 1999; INGLIS und KALISCHUK, 2003; MAHER, 2003) mit Hilfe der PCR erbracht worden (Tabelle 11).

Basiert der Nachweis von *Campylobacter* spp. auf molekularbiologischer Methodik liegt die methodische Nachweisgrenze des Systems meist im Bereich von  $10^1$  bis  $10^3$  KbE/ml bzw. g und liegt somit deutlich niedriger als bei immunologischen Nachweissystemen (Tabelle 11). Eine Nachweisgrenze bei genotypisch basierenden Tests wird von DE BOER und BEUMER (1999) mit  $10^3$  KbE/ml bzw. g angegeben.

Es muß, wie schon in Kapitel 2.3.3 beschrieben, auch hier zwischen der methodenabhängigen Nachweisgrenze und der Nachweisgrenze unterschieden werden, bei der eine Keimzahl von den Autoren angegeben wird, die nach Durchführung eines Anreicherungs-schritts benötigt wird, um vom System noch detektiert zu werden. Meist ist letztere eine errechnete Keimkonzentration (EYERS et al., 1993).

Ein direkter Vergleich der Nachweisgrenzen verschiedener Systeme untereinander ist schwierig, da die Versuchsbedingungen unterschiedlich sind. So ist eine Ermittlung der Nachweisgrenze auch davon abhängig, ob und mit welcher Dotierungsmatrix gearbeitet wurde, da diese möglicherweise eine konkurrierende Begleitflora zum Zielkeim besitzt.

Auf Grund dessen wird für die Ermittlung der Nachweisgrenze zunächst empfohlen auf eine Matrix mit möglicherweise vorhandenen, undefinierten Begleitkeimen zu verzichten und Reinkulturen, aufgeschwemmt in keimfreier Flüssigkeit, zu verwenden. Erst dann ist eine Zielkeim-freie Matrix bei gleichzeitiger Bestimmung enthaltener Begleitkeime einzusetzen (ANONYMUS, 1999).

Um eine hohe, effektive Sensitivität des molekularbiologischen Systems zu gewährleisten, muß dem DNA-Extraktionskit besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Verluste der Ziel-DNA durch den Extraktionsvorgang müssen so niedrig wie möglich gehalten werden, um falsch-negative PCR-Ergebnisse auszuschließen (OPFER et al., 2001).

Auch die Kombinationen aus molekularbiologisch und immunologisch basierender Methodik für den Nachweis von *Campylobacter* spp. wird von Autoren beschrieben (PATEL et al., 1997; METHERELL et al., 1999; GRENNAN et al., 2001; HONG et al., 2003). Die Nachweisgrenze eines solchen Systems liegt beispielsweise in der von HONG et al. (2003) beschriebenen PCR-ELISA bei  $4 \times 10^1$  KBE/ml. Studien von GRENNAN et al. (2001) wiesen für das von ihnen angewandte System eine Nachweisgrenze von 100-300 fg (40-120 Zellen) bzw. 10 fg (4 Zellen) aus.

Eine neuere molekularbiologische Methode, bei denen auf die arbeitsintensive Gel-Elektrophorese der klassischen PCR verzichtet werden kann, stellt die Real-time PCR dar. Der Nachweis kann hier innerhalb kürzester Zeit, jedoch mit relativ hohem apparativem Aufwand, erbracht werden (NOGVA et al., 2000; LOGAN et al., 2001; COOPER et al., 2002; BEST et al., 2003; SAILS et al., 2003; LUND et al., 2004; ABU-HALAWEH et al., 2005).

Auch die jüngere Entwicklung der Microarray Technik, die auf der Hybridisierungsmethodik beruht, wird zum Nachweis von *Campylobacter* spp. verwendet. DNA-Sonden, die auf einer festen Unterlage arretiert sind, fangen nur spezifische Ziel-DNA ab. So kann vorher markierte Ziel-DNA pathogener Keime sichtbar gemacht werden. Der parallele Nachweis verschiedener Pathogene in Proben wird möglich (DORELL et al., 2001; MÜFFLING et al., 2003).

**Tabelle 11:** Nachweisgrenze verschiedener molekularbiologischer Nachweissysteme zum Nachweis von *Campylobacter* spp. aus dotierten Proben

Nachweissystem		Dotierte Probenart	Nachweisgrenze [KbE/ml bzw. g]	Quelle	
Molekularbiologische Methode	Real-time PCR	Kotprobe	1 x 10 <sup>3</sup> 100-150	LAGIER et al., 2004 LUND et al., 2004	
		Reinkulturen	1 x 10 <sup>2</sup>	CHENG und GRIFFITHS, 2003	
	Kombiniert mit Microarray	Lebensmittel (Geflügelfleisch)	1 x 10 <sup>2</sup>	MÜFFLING et al., 2003	
	Kombiniert mit Filtrationstechnik	Fäzes	1 x 10 <sup>3</sup>	MISAWA et al., 2002	
	PCR basierende Fluoreszenz- Methode	Geflügelwasch- wasser	1 x 10 <sup>2</sup>	WANG et al., 2001	
	Kombiniert mit Fluorescent in situ hybridization (FISH)	Geflügelprodukte	10 KbE (mit A.) 1 x 10 <sup>2</sup> (o. A.)	MORENO et al., 2001	
	PCR Assay		Geflügelspülprobe	<0.3 MPN/ml n. A.	WANG, 2002
			Geflügelproben	500 (25 KbE/g vor A.)	GIESENDORF und QUINT, 1995
			Geflügelproben	500 12,5 KbE/PCR	GIESENDORF et al., 1992
			Reinkultur/DNA	12 (rechnerisch)	EYERS et al., 1993
			Wasser	3-15 KbE/100 ml (mit 18 h A.)	WAAGE et al., 1999
			Rind-, Geflügel-, Schweinefleisch	≤3 (mit 18 h A.)	
			Klinische Proben, LM	30-60	OYOFO et al., 1992
			Schlachthofproben, LM	5 (mit 24 h A.); 1,5 x 10 <sup>3</sup> (o. A.)	DENIS et al., 2001
			Reinkultur	1-5	FERMÉR und ENGVALL, 1999
PCR kombiniert mit immunomagnetic capture	Milch Geflügelhaut	1	WALLER und OGATA, 2000		

o.: ohne; n.: nach; A.: Anreicherung

## 2.5 Schnellmethoden

Der Nachweis eines potentiell pathogenen Bakteriums im Lebensmittel oder Fäzes sollte möglichst schnell zu führen und im Ergebnis richtig sein. Die angewandte Methode muß einfach und verlässlich sein, wobei ihre Empfindlichkeit und Spezifität zur Erkennung und Spezifizierung des Agens sowie ihr Differenzierungspotential bekannt sein muß

(SWAMINATHAN und FENG, 1994; WASSENAAR, 2000). Das Ergebnis hat zeitnah zu erfolgen (GUTTERIDGE und ARNOTT, 1989).

Ebenso sollte die Schnellmethode gegenüber einer Standardmethode (Methode nach §35 LMBG, ISO- oder DIN-Methode) validiert sein (FENG, 1996). In den USA erfolgt dies durch die AOAC (Association of Analytical Chemists), für die Europäische Union wird das Projekt MICROVAL initiiert.

Mikrobiologische Kontrollen erweisen sich im praktischen Einsatz oftmals als ungeeignet. Sie sind zeit- und arbeitsintensiv, erfordern fachlich geschultes Personal und die Ergebnisse liegen erst nach Tagen vor. Aus diesen Gründen ist damit zu rechnen, dass der Einsatz von Schnellmethoden zukünftig zunehmen wird (GUTTERIDGE und ARNOTT, 1989; WERLEIN, 1996).

Einsatzgebiete von Schnellmethoden liegen in der mikrobiologischen Eigenkontrolle von Lebensmittel- und Schlachtbetrieben oder aber in den staatlichen Kontrollinstitutionen, die beide auf zeitnahe Ergebnisse angewiesen sind (LIMACHER et al., 2001; BAUMGART et al., 2003).

Schnellmethoden werden normalerweise im Sinne eines Screenings verwendet. Dabei werden negative Resultate akzeptiert, positive Ergebnisse sind präsumtiv und müssen durch anerkannte offizielle Methoden bestätigt werden (FENG, 1996 und 2001; DIN 10134, 10.3). Dies ist jedoch kein Nachteil, da negative Resultate in der Lebensmittelmikrobiologie zumeist die Regel sind. Schnellmethoden sind durchschnittlich 1-2 Tage schneller als konventionelle kulturelle Standardmethoden (FENG, 1996)

Eine festgelegte Begriffsdefinition für „Schnellmethode“ (*engl.* „rapid method“) ist in der Literatur schwer auszumachen. Unter diesem Begriff verbirgt sich zumeist ein Sammelsurium an Testsystemen, die jedoch eines gemein haben: Sie führen schneller zum Ergebnis als konventionelle Methoden (IBRAHIM, 1986; DZIEZAK, 1987; FUNG et al., 1988; FUNG, 1991; STAGER und DAVIS, 1992; PATEL, 1994; FENG, 1996).

Neben verschiedenen kulturellen Schnellmethoden, bei denen ein Zeitgewinn über eine Verkürzung der Selektivanreicherung durch den Einsatz von Membranfiltrationstechniken (ISO-GRID™ Technik, Fa. BAG FOOD-CONTROL) erzielt wird (SHARPE, 1994; ENTIS et al., 1982), ist Konzentrierung und Nachweis von Bakterien auch mittels magnetisierbarer, Antikörper-beschichteter Kügelchen (Dynabeads®, Fa. Dynal) möglich (PATEL, 1994). Andere Systeme vereinfachen durch Miniaturisierung ihre Durchführbarkeit, sodass nach kultureller Isolierung die biochemische Bestätigung nach kurzer Zeit vorliegt (API® Campy, Fa. bioMérieux; Simplate for Campylobacter, Fa. BioControl). Diese Systeme, wie auch die

Immuno-Latex-Agglutination (Dryspot<sup>®</sup> Campylobacter, Fa. Oxoid; Slidex<sup>®</sup>, Fa. bioMérieux; Meritec<sup>®</sup> Campy, Fa. Meridian Diagnostics, Inc.) verkürzen die Konfirmation gewonnener Isolate ohne jedoch auf vorausgehende Isolationstechniken verzichten zu können.

Schnellmethoden fehlen für den direkten Nachweis in der Lebensmitteldiagnostik oftmals die notwendige Sensitivität und Spezifität. Die Lebensmittelmatrix benötigt daher einen Anreicherungsschritt. Obgleich dies die größte Limitierung neuer Methoden darstellt, hat die Anreicherung auch Vorteile. Dies sind beispielsweise der Verdünnungseffekt von vorhandenen Inhibitoren (wichtig bei molekularbiologischen Methoden), die Unterscheidungsmöglichkeit von lebenden und nicht-lebenden und damit vermehrungsfähigen Zellen wie auch die Möglichkeit gestresste Zellen wieder für die Vermehrung zu mobilisieren (FENG, 1996, 1997 und 2001). DEDISTE (2003) schaffte den Nachweis von *Campylobacter* spp. in Kotproben auch ohne Anreicherung innerhalb von 2 h.

Schnelle Nachweisverfahren für thermophile *Campylobacter* spp. basieren zumeist auf immunologischem und/oder molekularbiologischem Prinzip (Tabelle 12).

Das ELISA Prinzip, ist weit verbreitet, um Schnellmethoden für den Nachweis von Pathogenen und Toxinen in Lebensmittel zu entwickeln (SWAMINATHAN und KONGER, 1986; NOTERMANS und WERNARS, 1991; DEDISTE et al., 2003). Immunoassays sind meistverwendete Techniken in der Umwelt- und Lebensmittelmikrobiologie, die dem Schnellenachweis pathogener Mikroorganismen dienen (Tabelle 12). Sie sind im Gegensatz zu Nachweismethoden, die nach molekularbiologischem Prinzip arbeiten, weniger laborintensiv. Kommerziell erhältliche Kit-Systeme stehen zur Verfügung (DEDISTE et al., 2003), wobei verschiedene Antikörper zum Nachweis von Ziel-Antigen kombiniert zum Einsatz kommen oder aber polyklonale Antikörper Verwendung finden. Bei letzteren können jedoch auch Kreuzreaktionen mit Begleitkeimen in Erscheinung treten (ANDERSON und HARTMAN, 1985). Falsch-positive Ergebnisse können dann auftreten (SWAMINATHAN und FENG, 1994; JANEWAY und TRAVERS, 1995).

Falsch-negative Ergebnisse sollten bei einer Schnellmethode nicht vorkommen. Akzeptiert werden kann dagegen ein höherer Anteil falsch-positiver Ergebnisse (DE BOER und BEUMER, 1999).

Eine weitere auf dem immunologischen Prinzip beruhende Methode ist die Immunopräzipitation oder Immunochromatographie. Ähnlich dem „Sandwich-Prinzip“ im ELISA Verfahren, werden hier die zu detektierenden Antikörper mit farbigen Latexpartikeln oder kolloidalem Gold verbunden (Singlepath<sup>®</sup> Campylobacter, Fa. VWR). Diese Systeme

sind extrem einfach in der Durchführung, benötigen keine Waschschriffe und aufwendigen Apparaturen. Testergebnisse liegen in der Regel nach 20 Minuten vor (Tabelle 12).

Genotypische Methoden, wie die PCR, werden ebenfalls als Schnelldachweis eingesetzt (WOLCOTT, 1991, 1992), wobei kommerzielle Systeme, z. B. als vorgemischter Mastermix, auch hier erhältlich sind (Bactotype<sup>®</sup> Kit *Campylobacter*, Fa. Biotype<sup>®</sup> AG). Viele Assays sind zumeist auf den Nachweis ribosomaler RNA ausgelegt, wobei eine höhere Sensitivität erreicht wird, da diese bakterielle Nukleinsäuren natürlicherweise in großer Anzahl in den Zellen vorliegen (CURIALE, 1990; SWAMINATHAN und FENG, 1994; FENG et al., 1996; KALAMAKI, 1997).

Nach der DIN 10134 (10.3) ist die Verifikation der in einer PCR gewonnenen Amplifikate zu erfüllen. Dies kann z. B. durch eine Southernblot-Hybridisierung erfolgen, wobei die Sensitivität und Spezifität erhöht werden kann (OPFER et al., 2001).

Eine weitere eingesetzte Schnellmethode ist die Impedanzmessung (MOORE und MADDEN, 2002). Sie beruht auf Metabolisierung vorhandener Substrate eines Nährmediums durch Mikroorganismen. Entstehende Stoffwechselprodukte erniedrigen den Widerstand der Nährlüssigkeit. Hohe Keimkonzentrationen ( $10^{6-7}$  Zellen/ml) führen zu schnelleren, messbaren Widerstandsänderungen (WAWERLA, 1996, HARTMAN et al., 1992). Bewertungskriterien für den Einsatz dieser Schnellmethode stellten BÜLTE und STOLLE (1989) auf. Sie wiesen darauf hin, dass die Handhabung und Probenaufarbeitung einfach, die laufenden Kosten mittelhoch, jedoch die investiven Kosten hoch sind. Die Nachweisgrenze eines solchen automatisierbaren Systems liegt bei  $10^0$  KbE/g.

MOORE und MADDEN (2002) versuchen durch ihre Studien die Impedanzmessung für *Campylobacter coli* mit der Rapid Automated Bacterial Impedance Technique (RABIT) zu etablieren. In keinem der sechs untersuchten Medien zeigten die *Campylobacter*-Stämme ausreichende Impedanzänderungen, die einen Nachweis ermöglichen.

Kriterien, die zu einer Implementierung und routinemäßigem Einsatz einer Schnellmethode im Labor führen, sind unter anderem die Anwenderfreundlichkeit und Praktikabilität der Methode, die entstehenden Kosten und die offizielle Anerkennung des Testprinzips durch unabhängige und/oder staatliche Institutionen (HALL, 1994).

Sind Schnellmethoden automatisiert/computerisiert, können Testergebnisse visualisiert und dokumentiert werden. Die Übertragung der Daten über den Computer wird möglich (BOLTON und GIBSON, 1994) und eine Manipulation durch den Menschen wird aufgrund der

Automation unterbunden (FENG, 2001). Neue Methoden sind oft sensitiver, spezifischer und genauer als konventionelle (DZIEZAK, 1987; HARTMAN et al., 1992).

Kriterien für Schnellmethoden werden ebenso von FUNG (1991) beschrieben. Ihm sind folgende Attribute, die ein ideales, automatisiertes, mikrobiologisches Nachweissystem kennzeichnen, wichtig: Genauigkeit, Vielseitigkeit, Schnelligkeit, Akzeptanz, Einfachheit in der Anwendung, Einarbeitungszeit, Stabilität und Erhältlichkeit der Reagenzien, anfallende Kosten sowie die Qualität des technischen Services.

Hauptziel von automatisierten Schnellnachweisverfahren ist die Reduktion von labor- und zeitintensiven Prozeduren (SWAMINATHAN und FENG, 1994), wobei menschliche Fehler und Laborkosten reduziert werden sollen (HARTMAN et al., 1992). Wenige Systeme sind für den *Campylobacter*-Nachweis vollautomatisiert.

Das automatisierte VIDAS System der Fa. bioMérieux detektiert zeitgewinnend direkt über einen Erhitzungsschritt aus der Anreicherungsbouillon *Campylobacter*-Keime und kann verschiedene Assays für den Nachweis anderer Pathogene (*Listeria* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp.) parallel/simultan bewerkstelligen. Der völlige Verzicht auf eine kulturelle Bestätigung bei positivem Ergebnis ist seitens des Herstellers nicht vorgesehen. Auch amtliche Institutionen verlangen nach einer Verifikation mittels eines zweiten, z. B. kulturellen Nachweissystems, sodass zumindest negative Ergebnisse schnell vorliegen.

Für die Lebensmittelkontrolle ist im Fall von *Campylobacter*-Keimen ein qualitatives Ergebnis ausreichend (vorhanden oder nicht vorhanden). Auf ein quantitatives Ergebnis wird in der amtlichen Lebensmittelkontrolle zurzeit noch verzichtet, da minimale Infektionsdosen, die zu einem Krankheitsgeschehen führen, schon bei 1-10 Keimen liegen können. Eine Abwesenheit in 25 g Lebensmittel (Endprodukt), wie es bei Salmonellen praktiziert wird, scheint sinnvoll (NOTERMANS und BARENDZ, 2002).

Vielversprechend ist die Microarray-Technologie (Nutri<sup>®</sup>-Chip). Untersuchungen von MÜFFLING et al. (2003) zeigten, dass der simultane Nachweis von lebensmittelrelevanten Keimen wie *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* und *Listeria monocytogenes* im Lebensmittel (Hackfleisch, Geflügelfleisch, Frischei, Lachs, Käse, Speiseeis) innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt werden kann.

*Campylobacter*-Keime lagen bei diesen Dotierungsversuchen in Konzentrationen von 100 KbE/g im Lebensmittel vor und konnten sicher nachgewiesen werden.

Ein schneller Nachweis lebender Bakterien ist auch für nicht molekularbiologisch ausgerüstete Laboratorien über die VIT-Methode (vermicon identification technology, Fa.

vermicon AG) möglich. Ein *Campylobacter*-Kitsystem ist in Entwicklung (STEPHAN et al., 2003).

**Tabelle 12:** Kommerziell erhältliche Schnelldiagnostikverfahren für *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln und Fäzes (nach HARTMANN et al., 1992)

Verfahrensprinzip	Name	voraussichtliche Testdauer (inkl. Anreicherung)	Hersteller
Immunologisch (EIA, ELISA, ELFA, GLISA)	VIDAS® Campylobacter (CAM), ELFA	48 h	bioMérieux
	Transia Plate Campylobacter	46 h	Diffchamb AB
	Singlepath® Campylobacter, GLISA	49 h (inkl. 20 Minuten für den Test)	VWR
	Assurance® Gold Campylobacter, EIA	k. A.	BioControl Systems, Inc.
	ProSpecT Microplate Assay	2 h (ohne Anreicherung)	Alexon-Trend (TOLCIN et al., 2000)
Immunologisch (Elektrochemi-luminescence)	PATH/GEN® Campylobacter Test ORIGEN®-based Campylobacter Test	1 ½ h (exkl. Anreicherung ca. 24- 48 h)	IGEN International (OBISCO, 2001)
Nukleinsäure- hybridisierung (Reinkultur)	GenProbe Accuprobe Campylobacter (Konfirmation)	½ h (exkl. Anreicherung ca. 24-48 h)	bioMérieux Gen-Probe
Nukleinsäure- hybridisierung	SNAP	55 ½ h	Molecular Biosystems
Nukleinsäure- hybridisierung	GENE-TRAK Campylobacter Assay	50 h	Neogen Corporation
Polymerase- Kettenreaktion	Probelia PCR System	24 h	BioControl Systems, Inc.
Kombination ELISA, Immuno-Magnetic- Separation (IMS)	EIAFoss Campylobacter	48 h	Foss North America, Inc.

k. A.: keine Angabe

## 2.6 Validierung von Untersuchungs- und Prüfverfahren (Methodenvergleich)

Kommerzielle Testsysteme sowie amtliche Methoden von anerkannten nationalen oder internationalen Normierungsgremien bedürfen keiner Validierung, falls ausreichend Validierungsdaten aus anderen Quellen vorliegen. Sind vollständige Validierungsdaten nicht

zugänglich, ist das untersuchende Labor vor dem Einsatz einer neuen Methode angehalten, diese Parameter zu bestimmen. Erst so kann durch die gewonnenen Ergebnisse die Zuverlässigkeit eines neuen Prüfverfahrens für den Routineeinsatz festgestellt werden. Je nach Art der zu prüfenden neuen Methode (amtliche Methode, modifizierte amtliche Methode, Literaturmethode) ist das Spektrum der Validierungsparameter, und damit der Umfang der durchzuführenden Validierungsmaßnahmen, unterschiedlich ausgelegt. Ziel ist jedoch immer die Eignung des Prüfverfahrens für den beabsichtigten Anwendungszweck nachzuweisen (ANONYMUS, 2002).

Je nach Anwendungsbereich der neuen Methode sind Validierungsschritte bzw. Validierungsprotokolle und Arbeitsvorschriften für die Validierung von nationalen und internationalen Gremien aufgestellt worden (DAP, CEN). Dabei wird grundsätzlich zwischen der Validierung qualitativer und quantitativer Verfahren unterschieden.

Bei qualitativen mikrobiologischen Methoden, wie sie in der vorliegenden Arbeit Untersuchungsgegenstand sind, wird eine Validierung durch die Abschätzung folgender Parameter ermöglicht:

Positive/negative Abweichung, relative Genauigkeit (Accuracy), relative Empfindlichkeit (Sensitivität), relative Spezifität, relative Nachweisgrenze (Prüfung mit definierten Keimgehalten), Selektivität, evtl. Matrixeffekte bei der Untersuchung unterschiedlicher Proben. Die Plausibilität der alternativen Methode kann dabei durch den Vergleich mit einem anderen (Referenz-) Verfahren untermauert werden (ANONYMUS, 2002, 1999).

Die Arbeitsvorschrift nach dem Norm-Entwurf EN ISO 16140 (1999) umfasst für die Validierung alternativer Methoden zwei Phasen: eine *Verfahrensvergleichsuntersuchung* des alternativen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren sowie ein *Ringversuch* mit beiden Verfahren. Dabei muss die Validierung auch unter praxisnahen Bedingungen erfolgen.

Dies kann unter Zuhilfenahme von natürlicherweise kontaminierten Proben oder mit künstlich beimpften Produkten (Referenzstämme, Nicht-Zielkeime) unter simultaner Anwendung beider zu vergleichenden Methoden geschehen. Eine Vergleichbarkeit der Leistungsmerkmale der neuen Methode zu denen der Referenzmethode muß durch die Untersuchung identischer Proben erfolgen (BAUMGART et al., 2003)

Im Methodenvergleich unterscheiden sich die verschiedenen Nachweisverfahren hinsichtlich der oben genannten Verifizierungsparameter, in der Dauer bis zum Vorliegen eines Untersuchungsergebnisses sowie in der Praktikabilität der Durchführung der Methode. Im Hinblick des zukünftigen Einsatzgebietes einer solchen Methode spielt dabei der

aufzubringende Kostenfaktor (Verbrauchsmaterial, Gerätschaften etc.) ebenso eine entscheidende Rolle wie die technischen Möglichkeiten des Labors (siehe Kapitel Schnellmethoden).

Der Einsatz einer Methode in der lebensmittelhygienischen Routinediagnostik als Screeningverfahren ist nur dann effizient, wenn keine falsch-negativen Ergebnisse vorkommen und der Anteil an falsch-positiven Resultaten möglichst gering ausfällt (OPFER et al., 2001). Für die routinemäßige Einsetzbarkeit einer neuen Untersuchungsmethode sind somit ihre relative Sensitivität, Spezifität und letztendlich die Genauigkeit (Accuracy/Agreement) der Testmethode von entscheidender Bedeutung (Tabelle 13). Die Berechnung dieser Parameter erfolgt durch die Bildung von Untersuchungspaaren aus den jeweiligen Daten des Referenzverfahrens und des neuen Nachweisverfahrens. Hieraus resultieren dann beim Vergleich zweier Systeme folgende Werte: Anzahl positiver Übereinstimmungen (PA), Anzahl der Positivabweichungen (PD) sowie Negativabweichungen (ND) und Anzahl negativer Übereinstimmungen (NA). Der Voraussagewert einer positiven bzw. negativen Diagnose wird ermittelbar.

Bei der Bildung dieser Parameter im Vierfeldertest sollten die Proben, Matrizes und Produkte zuvor in Lebensmittelkategorien eingeteilt werden und auch einer kategorisierten Betrachtung unterworfen werden (ANONYMUS, 1999).

Die Untersuchung dotierten Probenmaterials bietet neben dem Vorteil der bekannten Anzahl *Campylobacter*-positiver Proben auch die Möglichkeit die Nachweisgrenze des Testsystems zu bestimmen. Über Dotierungsversuche kann dann die minimal notwendige Bakterienkonzentration bestimmt werden, die ein positives Ergebnis erbringt. Bei automatisierten Systemen ist dies beim Vorliegen eines vom Werk definierten Cut-off Wertes sicherlich zu diskutieren, da die Methode, die dem Nachweissystem zugrunde gelegt wird (z. B. immunologisches Verfahren), sicherlich eine noch niedrigere minimal bestimmbare Bakterienkonzentration nachweisen kann als die bei den Dotierungsversuchen ermittelte. Die Hersteller solcher Testsysteme sichern das positive bzw. negative Detektionsergebnis ab und beschneiden solche Bereiche in der Testprozedur, die womöglich unsichere Ergebnisse liefern.

Grundsätzlich wird in der Literatur zwischen der methodischen und gerätespezifischen Nachweisgrenze unterschieden (siehe Kapitel 2.3). Erstere Nachweisgrenze gibt die minimal nachweisbare Bakterienkonzentration in der Matrix an, wobei hier die Gesamtmethode, inklusive einer eventuell vorgeschriebenen Anreicherungsprozedur, betrachtet wird.

Bei der Betrachtung der gerätespezifischen Nachweisgrenze wird diejenige *Campylobacter*-Konzentration betrachtet, die mit der Durchführung der Anreicherungs-schritte erreicht werden muss, um ein positives Ergebnis durch diese Methode anzuzeigen.

**Tabelle 13:** Wichtige Untersuchungsparameter für den Validitätsnachweis einer Nachweismethode

Relative Spezifität = $\frac{100 \cdot NA}{N -} \cdot \%$	$N$ Gesamtprobenanzahl $N -$ Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Referenzverfahren
Relative Sensitivität = $\frac{100 \cdot PA}{N +} \cdot \%$	$N +$ Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Referenzverfahren
Relative Übereinstimmung (Test-Effizienz) = $\frac{100(PA + NA)}{N} \cdot \%$	$PA$ positive Übereinstimmung beider Verfahren $NA$ negative Übereinstimmung beider Verfahren
Voraussagewert positive Diagnose = $\frac{100 \cdot PA}{A +} \cdot \%$	$A +$ Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Alternativverfahren
Voraussagewert negative Diagnose = $\frac{100 \cdot NA}{A -} \cdot \%$	$A -$ Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Alternativverfahren

Nach dem Normentwurf EN ISO 16140 (1999) ist die relative Nachweisgrenze die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen oder der von ihr stammenden Produkte, die mit einer 50 %igen Treffsicherheit durch das alternative oder das Referenzverfahren in der Probe nachgewiesen werden kann. Für ihre Ermittlung wird ein umfangreiches Verfahrensschema vorgeschlagen, in dem exakte Fisher-Tests oder aber der Chi-Quadrat-Test (z. B. McNemar-Test) die Ergebnisse statistisch absichern.

Der Konkordanzindex Kappa stellt das Maß für die Stärke des Zusammenhangs zweier gegenübergestellter Methoden in einer Vierfeldertafel dar (Tabelle 14). Der Kappa Wert weist die Übereinstimmung zwischen Testresultaten verschiedener Nachweissysteme nach (MARTIN et al., 1987)

Für die jeweilige Matrix werden in der ISO 16140 neben Zielkeimen auch Nicht-Zielkeime, welche mögliche störende Einflüsse (Interferenzen) gegenüber dem Zielkeim ausüben könnten, in Listen vorgestellt. Demnach sind *Campylobacter* spp. Insbesondere Zielkeim in rohen (Geflügel)-Fleischprodukten, in rohen Fisch- und Molkereiprodukten sowie rohem Obst und Gemüse.

**Tabelle 14:** Konkordanzindex Kappa

$\text{Kappa} = \frac{2(ad - bc)}{(a + c)(c + d) + (a + b)(b + d)}$	<b>Kappa</b>	<b>Zusammenhang</b>
	<0,01	ohne
	0,10-0,40	schwach
	0,41-0,60	deutlich
	0,61-0,80	stark
	0,81-1,00	fast vollständig
<i>a positive Übereinstimmungen beider Verfahren</i> <i>b positive Abweichungen</i> <i>c negative Abweichungen</i> <i>d negative Übereinstimmungen beider Verfahren</i>		