

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

Natürlich und artifiziell kontaminierte Proben vom Geflügel wurden kulturell, immunologisch und molekularbiologisch im Hinblick auf *Campylobacter* spp. untersucht (Abb. 1).

In den Jahren 2001 bis 2003 wurden frische und gefrorene Geflügelfleischproben aus dem Berliner Einzelhandel, Putenkottupfer vom Schlachthof sowie ein artifiziell kontaminiertes Modellbrät aus Geflügelfleisch auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. hin untersucht. Hierbei kamen der miniVIDAS® *Campylobacter* (CAM) Assay der Fa. bioMérieux (ELFA), der Singlepath® Assay der Fa. Merck (GLISA), die PCR nach dem Methodenentwurf zur Amtlichen Sammlung §35 LMBG sowie als Referenzmethode der kulturelle Nachweis in Anlehnung an die internationale Norm (ISO 10272) zum Einsatz.

Dabei wurden 394 Proben von gefrorenem (n=46) und frischem (n=49) Geflügelfleisch, gefrorenen (n=45) und frischen (n=93) Geflügelinnereien sowie Geflügelkottupfern aus vier Puten-Mastbetrieben (n=161) auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht.

Artifiziell mit *Campylobacter* spp. kontaminiertes Geflügelfleisch und nativ mit *Campylobacter* spp. kontaminierte Proben (Lebensmittelproben vom Geflügel und Putenkottupferproben) wurden parallel mit dem ELFA- und GLISA-System, wie auch mit der kulturellen und molekularbiologischen Methode untersucht.

Eine ausgewählte Stichprobe wurde molekularbiologisch auf *Campylobacter* spp. untersucht.

Auch sind Proben, die im immunologischen oder kulturellen Ergebnis fraglich erschienen, mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht worden (vorläufige §35-PCR). Eine Realtime-PCR verifizierte das molekularbiologische Ergebnis der Standard-PCR (siehe 3.3.6).

Die Abbildung 8 verdeutlicht die Einmündung der verschiedenen Probenmatrices in die unterschiedlichen Nachweissysteme.

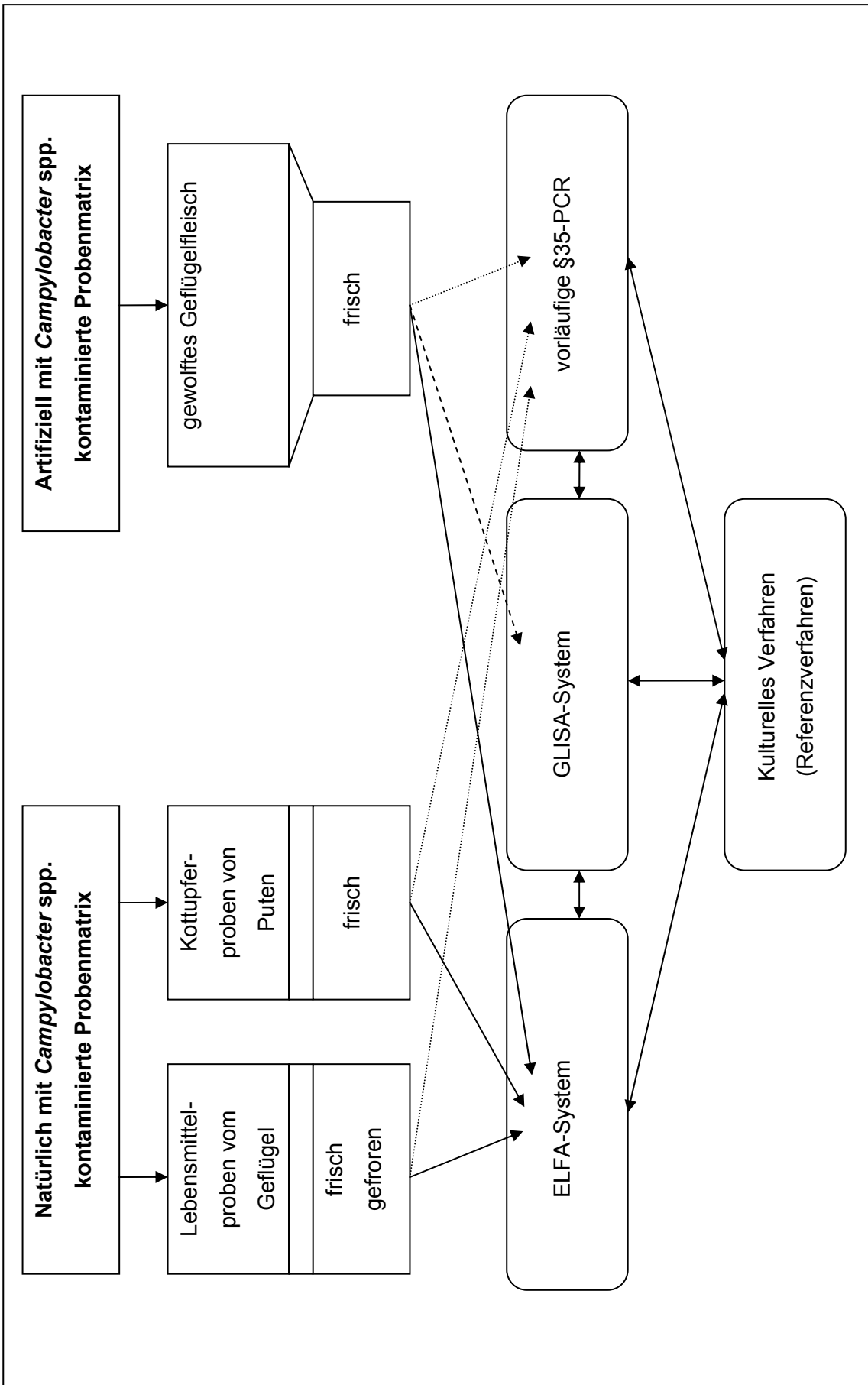


Abbildung 8: Versuchsaufbau

3.2 Proben und Geräte

Für die eingehende Beschreibung der Geräte, Materialien und Reagenzien (Typenbezeichnungen, Artikel-Nummern, Herstellerangaben etc.) und die Zusammensetzung sowie Beschreibung der Inhaltsstoffe und Zusammensetzung der festen und flüssigen Nährmedien wird auf den Anhang A verwiesen.

3.2.1 Typ- und Referenzstämme

Als *Campylobacter*-Referenzstämme und Stämme zur Spezifitätsbestimmung sind Kulturen aus den nationalen Sammlungen der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen (DSMZ), der American Type Culture Collection (ATCC) sowie aus der hauseigenen Stammsammlung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) verwendet worden. Es handelte sich um die in Tabelle 15 gelisteten Typ- und Feldstämme.

Für die Differenzierung der *Campylobacter*-Isolate aus den Proben, als Testkeim bei den Vorversuchen zu Einmischversuchen und als Kontrollstamm (Positiv- und Negativkontrolle) kamen *Campylobacter*-Stämme aus der DSMZ zur Anwendung. Die verwendeten Stämme lagerten im Stammhaltungssystem für Mikroorganismen (Cryobank™, Fa. MAST DIAGNOSTIKA, Germany) bei -80 °C. Die Aktivierung der Stämme wurde nach den Vorgaben der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig) durchgeführt.

Für *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*, im Folgenden als *Campylobacter jejuni* bezeichnet wurde der Bakterienstamm DSM 4688^T, für *Campylobacter coli* der Stamm DSM 4689^T und für *Campylobacter lari* der Stamm DSM 11375^T verwendet. Sie wurden für die Durchführung innerhalb der Methodenvorschriften nach ISO 10272 und den immunologischen Verfahren (miniVIDAS®-System, Fa. bioMérieux Singlepath®-System, Fa. Merck) als Positivkontrollen eingesetzt sowie deren DNA in der molekularbiologischen Methode für die positiven Kontrollbanden im Agarose-Gel genutzt. In den Vorversuchen zur Einmischtechnologie wurde *Campylobacter jejuni* in Modellbrät aus gewolfem Geflügelfleisch eingearbeitet. Bei den Versuchen zur Nachweisgrenze der immunologischen Verfahren (siehe Kapitel 3.3) wurde das Modellbrät mit den DSM-Stämmen für *Campylobacter jejuni* (DSM 4688^T) und *Campylobacter coli* (DSM 4689^T) artifiziell kontaminiert.

Weiterhin wurden die oben genannten DSM-*Campylobacter*-Stämme zur Bestimmung der Spezifität der immunologischen Verfahren wie auch die Stämme *Campylobacter upsaliensis* (DSM 5365^T) und *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* (DSM 5361^T) verwendet.

Tabelle 15: Verwendete DSM-, ATCC- und Feldstämme für die Spezifitätsbestimmung der immunologischen Verfahren (Ziel- und Nicht-Zielkeime)

Gram-positive Mikroorganismen	Gram-negative Mikroorganismen
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	<i>Aeromonas hydrophila</i> ssp. <i>hydrophila</i> (DSM 30187 ^T)
<i>Brochothrix thermosphacta</i> (DSM 20171 ^T)	<i>Arcobacter butzleri</i> (DSM 8739 ^T)
<i>Clostridium bifermentans</i> (DSM 630)	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (DSM 7289 ^T)
<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 2570, QS)	<i>Arcobacter skirrowii</i> (DSM 7302 ^T)
<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 2146, QS)	<i>Campylobacter upsaliensis</i> (DSM 5365 ^T)
<i>Lactobacillus sakei</i> (C1 104/2)	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i> (DSM 5361 ^T)
<i>Listeria innocua</i> (DSM 20649 ^T)	<i>Campylobacter jejuni</i> (DSM 4688 ^T)
<i>Listeria ivanovii</i> (DSM 20750 ^T)	<i>Campylobacter coli</i> (DSM 4689 ^T)
<i>Listeria monocytogenes</i> (DSM 12464)	<i>Campylobacter lari</i> (DSM 11375 ^T)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	<i>Citrobacter freundii</i> (L 30/1)
<i>Staphylococcus aureus</i> (DSM 1104, QS)	<i>Enterobacter cloacae</i> (EN 45)
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922, QS)
	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 50071 ^T)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium var. C (H 7.2)
	<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i> (ATCC 9610 ^T)

QS: Qualitäts-Kontrollstamm

T: Typstamm

3.2.2 Modellbrät

Für die Versuche zur Sensitivitätsbestimmung der immunologischen und molekularbiologischen Verfahren wurde eine standardisierte, künstlich kontaminierte Fleischmatrix (Modellbrät) hergestellt.

Als Ausgangsmaterial für das Modellbrät wurde Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel verwendet, welches zuvor im Rahmen von Untersuchungen zur Ermittlung der Belastung dieser Lebensmittelkategorie auf *Campylobacter* spp. hin untersucht worden war. Die bei diesen Untersuchungen *Campylobacter*-negativ getesteten Proben wurden bei -18 °C bis zu 6 Monate gelagert. In Vorversuchen fand dann eine Verarbeitung zu einer in Chargen abgepackten, gewolfen Geflügelfleischmatrix statt.

In weiterführenden Vorversuchen war die Herstellung des artifiziell kontaminierten Modellbrätes aus dieser Geflügelfleischmatrix durchgeführt worden. Hierbei wurde das mit thermophilen *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* (DSM 4688) artifiziell kontaminierte Modellbrät hergestellt und die dabei notwendige Homogenisierungstechnik für diese Bakterienspezies in der Geflügelfleischmatrix ermittelt. Für die Beschreibung der Herstellungstechnologie des Modellbrätes und die hierbei eingesetzte Homogenisierungstechnologie wird auf das Kapitel 3.3. Herstellungs- und Untersuchungsmethoden verwiesen.

3.2.3 Lebensmittel

Innerhalb der Probengruppe der Lebensmittel kamen insgesamt 490 Geflügelproben aus dem Berliner Einzelhandel zur Untersuchung. Die Proben wurden im Zeitraum zwischen 2001 bis 2003 im Lebensmittelhandel gezogen. Beprobungen wurden über ein möglichst gleichmäßig verteiltes Beprobungsgebiet durchgeführt, so dass eine Mehrfachuntersuchung von Proben aus gleichen Chargen des Herstellers größtenteils vermieden wurde.

490 Proben wurden kulturell untersucht. Sie schlüsselten sich in 252 Geflügelinnerei- und 238 Geflügelfleischproben auf.

Sowohl verpackte Waren aus dem SB-Bereich als auch lose Geflügelwaren an der Supermarkt-Theke und den Verkaufsständen auf Berliner Marktplätzen sind als Probe gezogen worden.

Hiervon wurden 233 Proben für die Vergleichsuntersuchung der unterschiedlichen Nachweissysteme verwendet. Die Lebensmittelkategorien umfassten dabei Geflügelfleisch (n = 95) und Geflügelinnereien (n = 138), wobei auf die Kategorien gefrorenes Geflügelfleisch 46 Proben, frisches Geflügelfleisch 49 Proben, gefrorene Geflügelinnereien (Leber, Herzen, Mägen, Hals) 44 Proben und frische Geflügelinnereien 94 Proben entfielen.

Die Proben sind gekühlt vom Händler zum Labor transportiert worden und wurden am Kauftag oder aber spätestens nach drei Tagen ab Kaufdatum auf thermophile *Campylobacter* spp. untersucht. Es kamen zwei immunologische (3.3.4), ein molekularbiologisches (3.3.5) und die kulturelle Methode in Anlehnung an die ISO 10272 zur Anwendung.

Der Probeneingang wurde dokumentiert, indem das Kaufdatum, der Untersuchungsbeginn, das Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) bzw. Verbrauchsdatum (VD), die Verpackungsart, Probenbezeichnung, Geflügelfleischart (Hähnchen, Pute) sowie die Angebotsform (gefroren, frisch) erfasst wurden. Das Verbrauchsdatum war bei Untersuchungsbeginn bei fünf Proben

überschritten. Jede Probe bekam eine Identifikations-Nummer. Für die genaue Probenbezeichnung wird auf das Tabellenwerk im Anhang C verwiesen.

3.2.4 Geflügelkottupfer

In dieser Probengruppe wurde Geflügelkot aus der Kloake von männlichen und weiblichen Puten in einem sächsischen Schlachthof im August 2002 gewonnen (Anlage F). Die Geflügelkotproben sind am Schlachtband an frisch geschlachteten Puten direkt nach dem Entbluten und noch vor dem Brüh- und Rupfprozess genommen worden. Der Kot wurde unter Zuhilfenahme einzeln steril verpackter Wattetupfer (Fa. Falcon) aus der Kloake entnommen, ohne dabei mit der Tupferspitze mit kotverschmutztem Gefieder in Berührung zu kommen. Anschließend wurden die Kottupferproben komplett mit dem Wattetupfer in ein speziell für *Campylobacter* geeignetes Transportmedium verbracht. Es handelt sich um ein halbfestes Agar-Medium, welches sich für den Transport in einem Reagenzglas mit Metallkappe befindet. Das so genannte modifizierte Cary-Blair-Transport-Medium (Oxoid CM 519 mit 1%igem Zusatz von Na-Pyruvat) wurde zusammen mit der Tupferprobe bei Temperaturen von ca. 6 °C bis zu drei Tage gelagert. Der Tupfer wurde dabei bis zu einem Drittel in den Nährboden eingeführt und der über das Reagenzglas hinausragende Teil des Holzschafftes abgebrochen.

Nach dem abschließenden Beprobungszeitraum von drei Tagen wurden insgesamt 161 Kottupferproben von Putenherden aus vier Mastbetrieben (A-D) vom Schlachthof zum mikrobiologischen Labor des BfR transportiert und den Untersuchungen auf *Campylobacter* spp. zugeführt (siehe 3.1). Für die zwischen den Beprobungstagen stattgefunden Lagerung der Proben wurde ein bei 6 °C temperierter Kühlraum am Schlachthof verwendet. Auf dem Transport zum Labor ist eine mit thermoelektrischen Elementen kühlbare Transport-Box (Fa. Waeco International GmbH), in der eine Temperatur von 6 °C bis 8 °C mit zusätzlichen Kälteelementen erreicht wurde, benutzt worden.

3.3 Herstellungs- und Untersuchungsmethoden

3.3.1 Vorversuche – Homogenisierung

In Vorversuchen fand die Ermittlung der für die weiteren Versuche notwendigen Homogenisierungstechnik von thermophilen *Campylobacter* spp. (DSM 4688^T) in einer Fleischmatrix (Modellbrät) statt. Die Herstellung des Modellbrätes aus Geflügelfleisch und die Einmischtechnik zur Herstellung der artifiziell kontaminierten Fleischmatrix werden im Folgenden beschrieben.

Herstellung der Grundmatrix Modellbrät: Kulturell und molekularbiologisch *Campylobacter*-negativ getestetes Puten- und Hähnchenfleisch aus den Versuchen zum Vorkommen von *Campylobacter* wurde entbeint, durch einen Tischfleischwolf über eine 3 mm Lochscheibe gewolft (Fa. MaDo Maschinenfabrik Dornhan) und zu Chargen von ca. 3 bis 4 kg gemischt. Haut wurde am Fleisch belassen und kam mit zur Verarbeitung. Eine erneute Testung der Chargen auf *Campylobacter* spp. wurde durchgeführt. Hierbei wurden 5 Proben zu je 25 g pro Charge gezogen und in Anlehnung an die internationale Norm ISO 10272, im GLISA, in der PCR und im ELFA auf Anwesenheit thermophiler *Campylobacter* untersucht. Anschließend wurden Einzelchargen zu je 1 kg bis 1,5 kg gebildet und über eine 25 g Probe ebenfalls auf *Campylobacter*-Anwesenheit getestet. Chargen galten dann als *Campylobacter*-negativ, wenn alle Einzelproben negativ getestet wurden. *Campylobacter*-negative Chargen wurden bis zur weiteren Herstellung des artifiziell kontaminierten Modellbrätes unter Zuhilfenahme eines Folienschweißgerätes der Fa. Bosch eingeschweißt und tiefgefroren bei -18 °C gelagert.

Herstellung des Modellbrätes: Bei der Herstellung des artifiziell mit *Campylobacter jejuni* kontaminierten Brätes wurden Chargen von 2 kg im Umlaufkutter (Fa. Eduard Müller & Söhne, Saarbrücken) erstellt. Dabei wurde die tiefgefrorene Fleischmatrix über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C aufgetaut. 1800 g angetautes Geflügelfleisch wurde über ein bis zwei Runden im Umlaufkutter zerkleinert. Über drei weitere Runden wurde 200 g Scherbeneis hineingearbeitet. Anschließend sind 2x 10 g Proben für die Bestimmung der Begleitkeime (siehe 3.3.7) im undotierten Fleisch der Gesamtmasse entnommen worden. Eine Beimpfung des Geflügelfleisches fand dann mit einer Bakteriensuspension, die eine definierte Keimkonzentration an *Campylobacter jejuni* aufwies, statt (siehe 3.3.2).

20 ml der Keimsuspension wurden hierbei über eine sterile Glaspipette über zwei bis vier Kutterunden zugegeben. Nach weiteren 30 Runden (ca. 150 Sekunden) im Umlaufkutter (Fa. Eduard Müller & Söhne GmbH & Co., Hameln) mit der Geschwindigkeitsstufe 2 wurden 25 g Einzelproben steril entnommen und für den Transport zum Labor in eine Petrischale (Nun Colon[®], Fa. Delta InterMed, Dänemark) verbracht.

Verwendung fanden die Modellbrätproben in den Versuchen zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität sowie zur Ermittlung der Nachweisgrenzen der immunologischen und molekularbiologischen Verfahren.

Das Fließschema der Abbildung 9 verdeutlicht den Ablauf des Herstellungsprozesses des Modellbrätes.

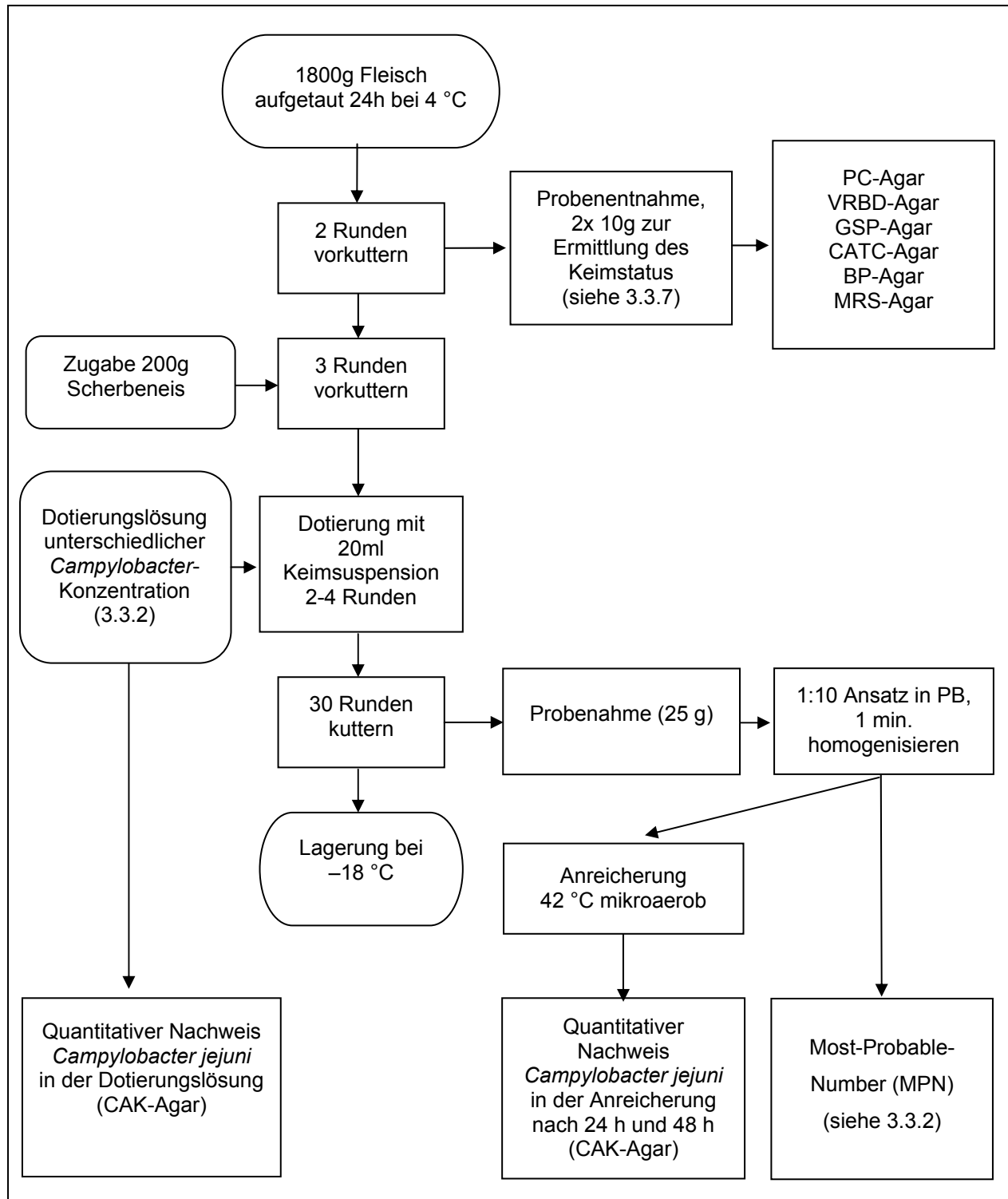


Abbildung 9: Schema des Herstellungsprozesses für das Modellbrät

Plate Count-Agar (PC-Agar); Staphylokokken-Selektivagar nach Baird – Parker (BP-Agar); Citrate Azide Tween Carbonate Agar (CATC-Agar); Glutamat Stärke Phenolrot-Agar (GSP-Agar); *Lactobacillus*-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar); Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel (VRBD-Agar); *Campylobacter*-Agar nach Karmali (CAK-Agar); Most Probable Number (MPN); Preston-Bouillon (PB)

3.3.2 Herstellung der Beimpfungssuspension und quantitative Bestimmung der *Campylobacter*-Konzentration im Modellbrät

Beimpfungssuspension: Das Modellbrät aus einer Geflügelfleischmatrix wurde mit einer Beimpfungssuspension kontaminiert, die daraufhin eine definierte Keimkonzentration an *Campylobacter* spp. pro Gramm Matrix aufwies. Für die Einmischversuche wurde der Stamm *C. jejuni* ssp. *jejuni* (DSM 4688^T) verwendet. Er wurden zuvor auf MHB-Agar bei 42 °C in einem begasbaren Brutschrank (Fa. Binder) mikroaerob in einer Gasatmosphäre von 5% O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂ über 48 Stunden angezüchtet. Der Prozessablauf zur Herstellung der verwendeten Ausgangssuspension wurde in Vorversuchen ermittelt (siehe 3.3.1). So war die zu erwartende *Campylobacter*-Keimkonzentration innerhalb des Flüssigmediums nach 24 h mikroaerober Bebrütung einschätzbar.

Zur Herstellung der Beimpfungssuspension wurde zunächst eine Öse Koloniematerial von der MHB-Agarplatte gewonnen und in 20 ml Brucella-Bouillon (BB) überimpft. Dabei wurde *Campylobacter*-Koloniematerial an der Innenseite des Erlenmeyerkolbens kurz oberhalb des Flüssigkeitsspiegels verrieben und dann in die Brucella-Bouillon eingerieben. Eine mikroaerobe Bebrütung bei 42 °C über einen Zeitraum von 24 h schloss sich an. Die Keimkonzentration wurde über eine dezimale Verdünnungsreihe auf Karmali-Agar im Doppelansatz bestimmt. Zum Einsatz kamen der Whitley Automatic Spiral Plater (WASP, Fa. dw-Scientific, England) und ein computergestütztes Kolonieauszählgerät mit der Software Synbiosis[®] (ProtoCOL[®] System, Synoptics Limited, England).

Die nach 48 h ermittelte *Campylobacter*-Konzentration pro Milliliter Brucella-Bouillon wurde auf die zu beimpfende Masse (1800 g Fleisch mit 200 g Scherbeneiszusatz) umgerechnet und die theoretisch vorliegenden Keimkonzentration im artifiziell kontaminierten Modellbrät bei optimalem Homogenisierungsgrad der *Campylobacter* in der Matrix berechnet.

Modellbrät: Für die Ermittlungen der tatsächlich vorliegenden Keimkonzentration an lebensfähigen *Campylobacter* spp. im dotierten Fleisch wie auch in der 24 h und 48 h Anreicherungsbouillon nach Preston (Oxoid, England) kamen unterschiedliche Methoden zur Anwendung.

Jede Einzelprobe (25 g dotiertes Modellbrät) wurde bei einer zu erwartenden Keimkonzentration von über 2×10^2 KbE/g Fleischmatrix bzw. pro ml Preston-Anreicherungsbouillon (PB) quantitativ über die Spiralplatten-Methode untersucht (WASP, England). Das Spiralplattengerät wurde auf 100 µl Gesamtausgabe pro Nährmedium-Platte eingestellt. Die Probenmenge wurde logarithmisch in Form einer Archimedesspirale auf Karmali-Agarplatten (CAK A, Oxoid, England) aufgetragen.

Anschließend sind die beimpften Agarplatten für 48 h mikroaerob bei 42 °C im begasbaren Brutschrank bebrütet worden.

Die Agarplatten wurden über eine Bildanalysegerät (ProtoCOL[®], Synoptics Limited[®]) sowie unter zu Hilfenahme von Zähltabellen für die Segmentauswertung der Spiralplatte quantitativ ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach dem Schema der Firma dwScientific für eine Platte mit 8,6 cm Durchmesser und eine Totalvolumenmenge von 0,1 ml:

$$X^* = \frac{Z1 + Z2}{V}$$

Legende:

X*	arithmetischer Mittelwert der Kolonienzahl [KbE/g bzw. pro cm ²]
Z1	Anzahl der Kolonien im ersten Sektor
Z2	Anzahl der Kolonien im zweiten Sektor
V	Volumen zwischen 0,001 ml und 0,1 ml

Die unteren Nachweisgrenzen im Spiralplattenverfahren betragen 1,0 x 10² KbE/ml bzw. g bei 200 µl, 2,0 x 10² KbE/ml bzw. g bei 100 µl und 4,0 x 10² KbE/ml bzw. g bei 50 µl Probenflüssigkeit.

War die Einmischkonzentration in der Matrix in einem Bereich unterhalb der Nachweisgrenze des Spiralplattenverfahrens zu erwarten, wurde das Most-Probable-Number-Verfahren (MPN-Verfahren) nach J. C. DE MAN (1983) angewandt.

Die nach dem Prinzip von DE MAN statistisch ermittelten Keimkonzentrationen wurden in MPN/ml Anreicherungsbouillon bzw. g Modellbrät angegeben. Verwendung fand das MPN-Tabellenwerk für 3 x 1, 3 x 0,1, 3 x 0,01 g bzw. ml mit dem Prinzip der parallelen Beimpfung dreier Reagenzglas-Röhrchen pro Proben und Verdünnungsstufe (ISO 7218:1996(E)). Die untere Nachweisgrenze betrug < 0,30 MPN/ml bzw. g (drei negative Röhrchen). Die obere Nachweisgrenze ist mit > 110 MPN/ml bzw. g angegeben. Bei einer Keimdotierung mit einer zu erwartenden Keimkonzentration unterhalb 0,30 MPN/ml bzw. g fand das Prinzip der Beimpfung von fünf Reagenzgläsern pro Probe Anwendung. Die Auswertungstabellen für 5 x 1, 5 x 0,1 und 5 x 0,01 g (ml) kamen zur Anwendung. Die untere Nachweisgrenze betrug hier < 0,18 MPN/ml bzw. g, die obere ist mit > 160 MPN/ml bzw. g ausgewiesen.

Die Karmali-Agarplatten, die neben *Campylobacter*-typische Kolonien störende Begleitkeime aufwiesen, wurden manuell unter zu Hilfenahme des ProtoCOL[®] Auszählgerätes ausgewertet. Dabei sind *Campylobacter*-typische Kolonien am Monitor farblich markiert und die Koloniezahl über die Firmensoftware berechnet worden. Präsumtive *Campylobacter*-Kolonien wurden stichprobenartig im Phasenkontrastmikroskop als *Campylobacter* spp. bestätigt.

3.3.3 Kultureller Nachweis von *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. wurden in Anlehnung an die ISO 10272: 1995/ Cor.1:1996 (E) „Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Campylobacter* growing at 41.5 °C“ nachgewiesen. Auf Abweichungen wird hingewiesen.

Für die Lebensmittelproben, die Kottupferproben und das mit *Campylobacter* spp. artifiziell kontaminierte Modellbrät wurde das kulturelle Verfahren für den Nachweis auf *Campylobacter* spp. verwendet.

Probenansatz und erste Inkubation: Zunächst erfolgte das Ansetzen der selektiven Anreicherungsbouillon nach Preston (PB) (CM 67 mit den Zusätzen SR 204E, SR 84, SR 48C, Fa. Oxoid, Basingstoke, England). Im Verhältnis 1:10 wurden 25 g Einwaage des mit *Campylobacter* spp. natürlich kontaminierten Fleisches bzw. des artifiziell mit *Campylobacter* spp. dotierten Modellbrätes in 225 ml Preston-Bouillon über eine einminütige Homogenisierung im Probenbeutel mit Filtereinsatz (Typ Stomacher 400 Bags, Fa. Seward medical) im Beutelwalkmischgerät (Typ Stomacher 400 Lab Blender, Fa. Seward) homogenisiert. Geflügelinnereien wurden per Hand über eine Minute im Stomacherbeutel mit der Anreicherungsflüssigkeit massiert und nur die Spülflüssigkeit fand als Probe weitere Verwendung.

Im Gegensatz hierzu wurden die Kottupferproben ohne Homogenisierungsschritt direkt in ein Reagenzglas mit 9 ml PB verbracht.

Es folgte eine erste Inkubation der verschiedenen Probenmatrices unter mikroaeroben Bedingungen im begasbaren Brutschrank (Fa. Binder) über 24 h und 42 °C (+/- 0,5 °C). Die Bebrütung fand zeitweise auch in Anaerobiertöpfen mit Gasgenerierungskits statt (BBL CampyPak Plus mit Palladium Catalyst, Fa. Becton Dickinson oder Anaerocult C, Fa. Merck).

Passage auf Selektivagar und zweite Inkubation: Nach der ersten Inkubation wurde ein Ösen-Ausstrich von ca. 10 µl Anreicherungsflüssigkeit auf festem Selektivmedium nach Karmali (CAK A) (CM 935 mit Supplementzusatz SR 205E, Fa. Oxoid) vorgenommen und es erfolgte eine erneute Inkubation unter mikroaeroben Bedingungen über 48 h und 42 °C (+/- 0,5 °C). Ein paralleler Ausstrich auf einem zweiten Selektivnährboden wurde abweichend von der ISO 10272 nicht durchgeführt.

Nach Bebrütung wurde eine *Campylobacter*-typische Kolonie vom Karmali-Agar auf Müller-Hinton-Blutagar (MHB A) (CM 337 mit Schafblut-Zusatz, Fa. Oxoid) passagiert. Dabei wurden graue, z.T. silbrig-glänzende Kolonien, die konfluierenden oder runden und zarten Wuchs aufwiesen ausgewählt. Es folgte ein Inkubationsschritt unter mikroaeroben

Bedingungen über 24 h und 42 °C (+/- 0,5 °C) im begasbaren Brutschrank.

Identifizierung: Die vorläufige Identifizierung der *Campylobacter* spp. erfolgte zunächst über die **Gram-Färbung**. Verwendet wurde hierfür Kolonien der 24 h bebrüteten MHB Agarplatte. *Campylobacter* spp. zeigen Gram-negatives Anfärbeverhalten. *Campylobacter*-Keime stellten sich im Lichtmikroskop innerhalb des Hellfeldes bei einer 1000-fachen Vergrößerung (Ölimmersion) als kleine, Gram-negative, kommaförmige bis spiralig gewundene Stäbchen dar. Anschließend erfolgte die Kontrolle der **Beweglichkeit** (Motilitätsprüfung) im Phasenkontrastmikroskop (Typ Axioskop® 50 und AxioStar® plus, Carl Zeiss, Jena). Dabei zeigen *Campylobacter*-Keime im hängenden Tropfen eine schnelle, das Blickfeld durchquerende Bewegungsrichtung mit einer typisch spiralig-drehenden Beweglichkeit und besaßen eine kommaförmige bis korkenzieherartige Gestalt. Kokkoide Formen kamen ebenfalls vor.

Differenzierung: Die weiterführende Differenzierung der *Campylobacter*-Spezies wurde zunächst über den **Katalase-Test** durchgeführt: einige Kolonien der 24 h bebrüteten MHB Agarplatte wurden hierbei auf einem Objektträger verrieben, und ein Tropfen einer 3 %igen Wasserstoff-Peroxid-Lösung aufgetragen. Eine positive Reaktion wurde durch Bläschenbildung nach wenigen Sekunden angezeigt.

Der **Hippurat-Hydrolyse-Test** (Hipp-Test) nach HARVEY (1980) wurde mit Koloniematerial der 48 h bebrüteten MHB Agarplatte durchgeführt. 1 %ige Natrium-Hippuratlösung wurde frisch mit sterilem Aqua dest. hergestellt (0,1 g Hippursäure-Natriumsalz (Fa. Merck-Schuchardt) in 10 ml Aqua dest.). Anschließend wurden 0,4 ml dieser Lösung in sterile Reagenzröhrchen geben und mit einer Öse Koloniematerial der ersten Passage (MHB-Agar) beimpft, so dass eine trübe Suspension entstand. Eine Inkubation im Wasserbad über 2 h bei 37 °C schloss sich an. Pro Reagenzröhrchen wurden 0,2 ml einer 3,5 %igen Ninhydrin-Reagenz (3,5 ml Ninhydrin (Fa. Sigma) in 100 ml einer 1:1 Mischung aus Aceton und Butanol) zugegeben und weitere 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die Beurteilung des Tests war positiv zu bewerten bei einem Farbumschlag nach dunkelviolett. Bei gelblicher oder klarer Farbe war der Test negativ. Positiv- und Negativkontrolle wurden mitgeführt (Positivkontrolle: *C. jejuni* DSM 4688^T, Negativkontrolle: *C. coli* DSM 4689^T). Bei unklarem Ergebnis (zartviolett Farbe) wurde der Test wiederholt.

Abschließend wurde der **Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test** (IAH-Test) nach POPOVIC-UROIC et al. (1990) vorgenommen. Eine Öse Koloniematerial der 48 h bebrüteten MHB-Agarplatte wurde auf einem IAH-Test-Blättchen (Herstellung siehe Anhang A) verrieben und ein Tropfen Aqua dest. aufgetropft. Ein positives Ergebnis lag bei einer dunkelblauen Farbreaktion des Blättchens nach 5-10 Minuten vor. Eine schwach positive Reaktion war nach 10 bis 30

Minuten durch eine hellblaue Färbung des Test-Plättchens charakterisiert. Positiv- sowie Negativkontrollen wurden mitgeführt (Positivkontrollen: *C. jejuni*/*C.coli*, Negativkontrolle: *C.lari*).

Die Antibiotikaempfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure und Cephalothin wurde wie folgt durchgeführt: es wurden in einer zweiten Passage *Campylobacter* Kolonien in BB eingebracht und mikroaerob bei 42 °C (+/- 0,5 °C) 24 h im begasbaren Brutschrank inkubiert. 0,1 ml der BB wurden auf MHB-Agar ausgespatelt und die Agarplatten mit Antibiotika-Test-Blättchen belegt (Test Discs NA 30 µg bzw. KF 30 µg, Fa. Oxoid). Das Isolat wurde aufgrund des sich ausbildenden bzw. fehlenden Hemmhofes nach 24 h mikroaerober Bebrütung bei 42 °C (+/- 0,5 °C) im begasbaren Brutschrank bzw. 37 °C in einer mikroaeroben Arbeitsstation (MACS VA500, Fa. Don Whitley Scientific Limited, England) wie folgt beurteilt: sensibel (S) bzw. resistent (R). Abweichend der ISO 10272 wurde eine Inkubation der BB durchgeführt und die Bebrütungstemperatur für die MHB-Agarplatten von 37 °C auf 42 °C erhöht.

Tabelle 16: Differenzierungsmerkmale der Spezies des Genus *Campylobacter* der Familie *Campylobacteraceae* (nach VANDAMME u. GOOSSENS, 1992, gekürzt)

Spezies/ Subspezies	Katalase-Test	Hippurat- Hydrolyse-Test	Indoxyl-Acetat- Hydrolyse-Test	25 °C	43 °C	Empfindlichkeit		Gram-Verhalten	aerobes Wachstum
						Nalidixinsäure ₃	Cephalothin		
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	+	--	+	S (R)	R	--	--
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	V	V	+	--	-- ¹	S (R)	S	--	--
<i>C. coli</i>	+	--	+	--	+	S (R)	R ²	--	--
<i>C. lari</i>	+	--	--	--	+	R	R	--	--

1: schwach positiv nach Hensyl (1994); 2: variabel nach Hensyl (1994)

3: häufiges Auftreten von Nalidixinsäure-resistenten *C. jejuni* Stämmen möglich

+: positive Reaktion; --: negativ Reaktion; V: variable Reaktion; S: sensibel; R: resistent

Zum Test der Bakterien auf ihre **Wachstumsfähigkeit** bei Temperaturen von 25 °C und 43 °C wurde eine Öse der beimpften Brucella-Bouillon (BB) auf MHB-Agar ausgestrichen und bei den entsprechenden Temperaturen unter mikroaerober Atmosphäre über 48 h bebrütet. Thermophile *Campylobacter* spp. zeigen unterhalb 25 °C kein Wachstum.

Beurteilung: Eine vollständige Speziesdifferenzierung des Genus *Campylobacter* innerhalb der Familie *Campylobacteraceae* war nach Durchführung aller oben genannten Schritte am siebten Tag möglich. Sie erfolgte nach den in Tabelle 16 aufgeführten biochemischen und

physiologischen Differenzierungs-merkmalen für thermophile *Campylobacter*. Die Identifikation von präsumtiven thermophilen *Campylobacter* Kolonien war nach zwei bis drei

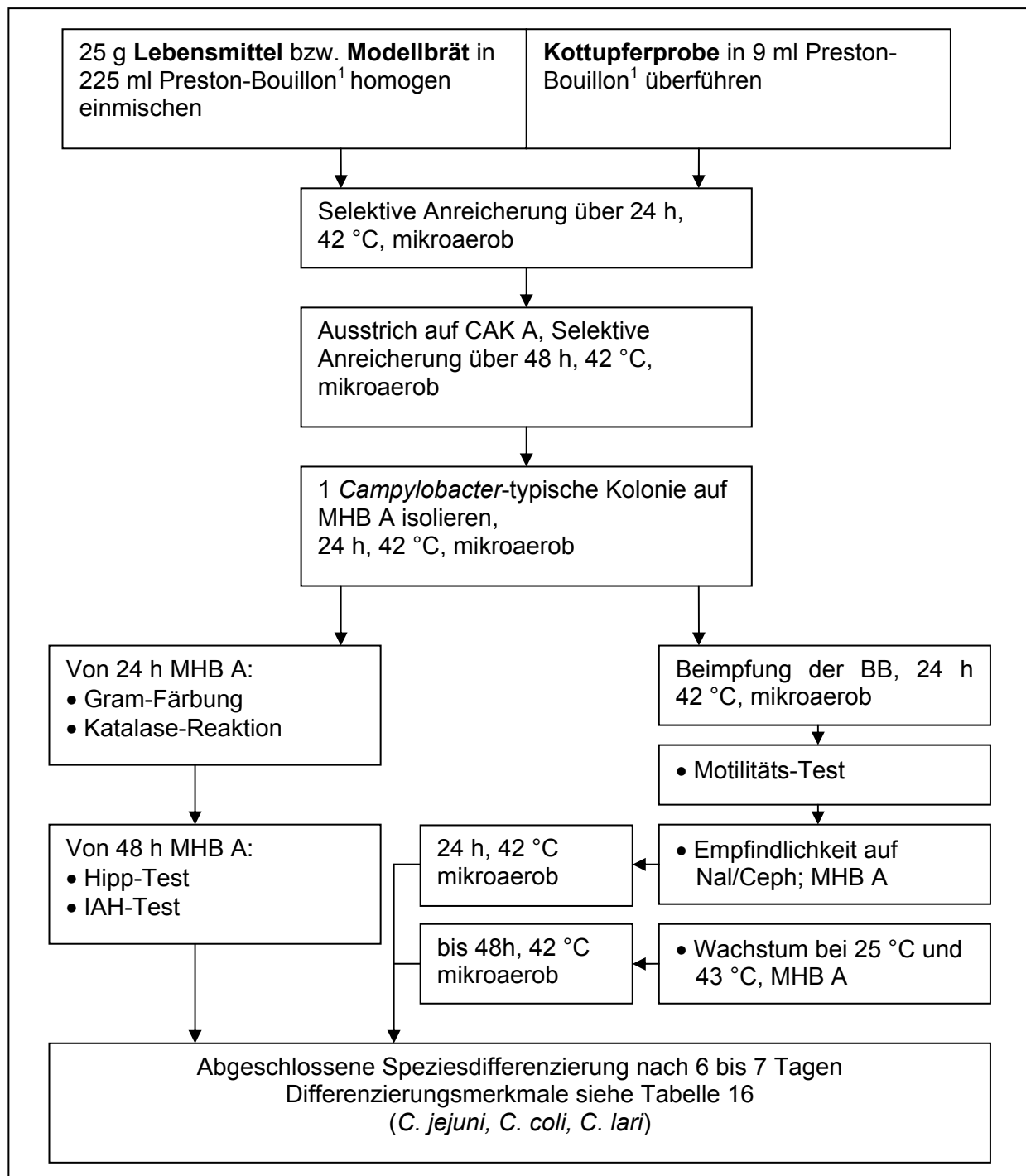


Abbildung 10: Fließschema des Untersuchungsganges zum kulturellen Nachweis auf *Campylobacter* spp. in verschiedenen Probenmatrices

Hipp-Test: Hippurat-Hydrolyse-Test, IAH-Test: Indoxyl-Hydrolyse-Test, CAK A: Karmali-Agar, BB: Brucella-Bouillon, MHB A: Mueller-Hinton-Agar, NaI: Nalidixinsäure, Ceph: Cephalothin; ¹ vorgewärmt auf Raumtemperatur

Tagen auf CAK A durchführbar. Den Gesamtablauf der kulturellen Untersuchungen auf *Campylobacter* spp. in Anlehnung an die ISO 10272 skizziert das Fließschema in der Abbildung 10.

3.3.4 Immunologischer Nachweis von *Campylobacter* spp.

Der immunologische Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. aus verschiedenen Probenmatrices wurde über zwei Systeme geführt. Dies ist zum einen das miniVIDAS®-System (Vitek – Immuno – Diagnostik – Assay – System) der Fa. bioMérieux Deutschland GmbH und zum anderen das System Singlepath® der Fa. VWR International Deutschland, Deutschland. Verschiedene Probenmatrices mündeten über einen gemeinsamen Anreicherungsschritt in beide Systeme ein (siehe 3.1). Parallel wurde das kulturelle Verfahren als Referenzverfahren in Anlehnung an die DIN EN ISO 10272 zu beiden Systemen geführt. Es fand dieselbe Anreicherung wie für die immunologischen Systeme Anwendung.

miniVIDAS®-System (ELFA, Enzyme-Linked Fluorescent Assay)

Das automatisierte miniVIDAS®-System diente dem qualitativen Nachweis von *Campylobacter*-Antigen-Strukturen unter Verwendung der CAM-Einzelriegel (Fa. bioMérieux). Der VIDAS CAM Assay weist thermophile *Campylobacter* der Spezies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* und *Campylobacter lari* über einen Anreicherungsschritt innerhalb von ca. 48 h nach.

Es wurde die Software-Version R4.2.6 und R4.10 benutzt. Für jede Reagenziencharge bzw. spätestens nach 14 Tagen wurde ein aktueller Standard im Doppelansatz für die Testläufe gesetzt (1-Punkt Rekalibration). Zum Ausschluss von Transportschäden wurde jede Reagenzienriegel-Charge über zwei Einzelriegel und unter Verwendung der mitgelieferten Positiv- und Negativproben getestet. Ebenfalls wurde für jede Charge die zugehörigen Masterlot-Daten über die vom Hersteller mitgelieferte Master-Lot-Karte ins System eingegeben. Negativ- und Positivproben wurden in den Testdurchläufen mitgeführt. Die für die Detektion von thermophilen *Campylobacter* spp. benötigten Verbrauchsmaterialien (CAM-Einzelreagenzienriegel, Festphasenrezeptor (FPR), Negativkontrolle (TRIS-NaCl-Tween, Natriumazid), Positivkontrollen (gereinigtes, inaktiviertes *Campylobacter* Antigen, Natriumazid, Proteinstabilisator), Standard (gereinigtes, inaktiviertes *Campylobacter* Antigen, Natriumazid, Proteinstabilisator)) sowie die Probenflüssigkeiten hatten bei Verwendung im Testsystem Raumtemperatur.

Nativ kontaminierte Proben: Lebensmittelproben (n = 394) aus dem Berliner Einzelhandel wurden in einer Selektivanreicherung nach PRESTON angesetzt. Es wurden Proben von frischem und gefrorenem Geflügelfleisch (n = 95) sowie frischen und gefrorenen Geflügelinnereien (n = 138) verwendet. Hierbei wurden 25 g je Lebensmittelprobe homogen in 225 ml Anreicherungsbouillon über ein Beutelwalkmischgerät (Stomacher® 400 Lab Blender, Fa. Seward medical, England) eingemischt. Nach 48 +/- 2 Stunden mikroaerober Bebrütung im begasbaren Brutschrank (Fa. Binder) (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) bei 42 °C fand die Anreicherung Eingang ins miniVIDAS®-System (ELFA, Enzym-Linked-Fluorescent-Immunoassay) und wurde nach Herstelleranweisung entsprechend bearbeitet. So wurden ca. 5 ml angereicherte Bouillon pro Probe in ein Reagenzröhrchen überführt und im Wasserbad (Fa. Köttermann GmbH & Co) 15 min bei 100 °C erhitzt. Das hierbei entstandene Koagulum wurde auf Raumtemperatur gebracht und im Röhrchen auf einem Reagenzglasschüttler (Fa. Heidolph) aufgebrochen.

Zwei bis drei ml Flüssigkeit wurden daraufhin über einen zweilagigen sterilen Gazefilter in ein neues Röhrchen dekantiert und von störendem Sediment bzw. Koagulum befreit. 500 µl gewonnenes Filtrat wurden abschließend in die erste Probenküvette eines VIDAS CAM Einzelreagenzienriegels pipettiert und das vorprogrammierte sowie kalibrierte miniVIDAS®-System gestartet. Die restliche unerhitzte Anreicherungsbouillon wurde bei < +4 °C zur Bestätigung positiver Ergebnisse als Rückstellprobe im Kühlschrank aufbewahrt.

Alle Reaktionsschritte wurden vom System automatisch durchgeführt. Dabei wurden *Campylobacter*-Antigene (Ag) im ELFA-Verfahren über polyklonale Antikörper (AK), die sich auf einem Festphasenrezeptor (FPR) befanden, erfasst. Der Testdurchlauf war nach circa 70 Minuten abgeschlossen.

Abweichend vom Protokoll des Herstellers, in dem der Nachweis von *Campylobacter*-Ag aus Nahrungsmitteln beschrieben wird, wurden Putenkottupfer mittels miniVIDAS®-System auf *Campylobacter*-Ag untersucht:

Die **Geflügelkottupfer** (n = 161) wurden gekühlt bei ca. 6 °C im modifizierten Cary-Blair-Medium zum Labor transportiert und in 9 ml PRESTON-Bouillon in ein Reagenzglas mit loser Metallkappe überführt. Die Bebrütungsdauer betrug 24 h bzw. 48 h bei 42 °C (+/-0,5 °C) unter mikroaeroben Bedingungen im begasbaren Brutschrank. Die Anreicherung fand in gleicher Weise wie die Lebensmittelproben Eingang ins miniVIDAS®-System (s. o.).

Artifizell kontaminierte Proben: Die Modellbrätproben aus Abschnitt 3.3 wurden sofort nach der Dotierung mit *Campylobacter jejuni* nach dem vom Hersteller vorgegebenen

Protokoll für Lebensmittel bearbeitet. Demzufolge wurden 25 g Probenmaterial mit 225 ml Anreicherungsbouillon nach PRESTON im Stomacher-Beutel mit Filtergazestreifen (Fa. Seward medical, Typ Stomacher®, England) homogenisiert. Nach einer mikroaeroben Bebrütung im begasbaren Brutschrank bei 42 °C über 48 h wurden über die Filterkammer des Stomacher-Beutels ca. 5 ml Anreicherungsflüssigkeit entnommen, nach einem Erhitzungsschritt bei 100 °C im Wasserbad dem ELFA-System in oben beschriebener Weise zugeführt und auf Anwesenheit von *Campylobacter jejuni* untersucht.

Ergebnisauswertung: Nach Beendigung des Tests wurden die Ergebnisse durch das miniVIDAS®-System analysiert. Das System führte dabei zwei Fluoreszenzmessungen für jede Probe in der optischen Küvette durch. Die erste stellte eine Hintergrundmessung der Küvette und des Substrats 4-Methyl-Umbelliferyl-Phosphat dar, die zweite Fluoreszenzmessung erfolgte nach Exposition des Substrats mit dem Konjugat Alkalische Phosphatase, welches die Umwandlung des Substrats zum fluoreszierenden Produkt 4-Methyl-Umbelliferon katalysierte. Der Endwert stellte abzüglich des Hintergrundwertes einen relativen Fluoreszenzwert (RFV) dar. In Relation zum bestehenden Standard wurde der Testwert wie folgt errechnet:

$$\text{Testwert} = \frac{\text{RFV Probe}}{\text{RFV Standard}}$$

Die Ergebnisse wurden wie folgt interpretiert:

Testwert	Interpretation
< 0,1	negativ
≥ 0,1 (cut-off)	positiv

Das Ergebnis war ungültig, wenn die Hintergrundmessung oberhalb des cut-off lag (Kontamination des Substrats). In diesem Fall wurde der Test mit der bei < +4 °C aufbewahrten Anreicherungsbouillon wiederholt. Die Ergebnisse waren ebenfalls ungültig, wenn für die Chargennummern des Reagenzienriegels kein gespeicherter Standard vorlag.

Die Probenergebnisse wurden über einen integrierten Computer und Drucker erfasst und dokumentiert. Der Befundausdruck enthielt Angaben über die Software und Protokollversion, Chargen-Nummer der verwendeten Reagenzien, Datum und Uhrzeit, Anwender, cut-off, sowie für jede Probe die Identifizierung, die Testbezeichnung, den RFV, den Testwert und die Interpretation (positiv, negativ).

Die vom Hersteller verlangte Bestätigung präsumtiv positiv detektierter Proben erfolgte auf blutfreiem Nährboden nach KARMALI, der 24 h bis 48 h bei 42 °C (+/- 0,5 °C) im begasbaren

Brutschrank mikroaerob bebrütet wurde. Proben wurden als *Campylobacter*-positiv eingestuft, wenn auf Karmali-Agar *Campylobacter*-typische Kolonien nachzuweisen waren.

Singlepath®-System (GLISA, Gold-Labelled-Immuno-Sorbent-Assay)

Das Singlepath®-System diente unter dem verwendeten Singlepath® *Campylobacter*-Protokoll (Fa. VWR International) dem qualitativen Nachweis von thermophilen *Campylobacter* in Lebensmitteln, unter anderem der Spezies *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*. Eine explizite Nennung der Spezies im Protokoll liegt nicht vor.

Artifizuell mit *Campylobacter jejuni* dotiertes Modellbrät aus Geflügelfleisch (siehe 3.3.2) wurde als Probenmaterial verwendet. Das Probenmaterial wurde analog des miniVIDAS®-Protokolls bzw. der kulturellen Methode in Anlehnung an die ISO 10272 aufgearbeitet. Abweichend wurde für die Probenanreicherung anstatt der im Singlepath®*Campylobacter*-Protokoll geforderten selektiven Anreicherungsbouillon nach BOLTON (Basis, Art.-Nr. 1.00069., mit Selektivsupplement, Art.-Nr. 1.00070., Fa. Merck) die Anreicherungsbouillon nach PRESTON (Fa. OXOID) verwendet.

Dieselbe Anreicherungsbouillon, die im miniVIDAS®-Protokoll sowie im kulturellen Nachweisverfahren in Anlehnung an die ISO 10272 zum Einsatz kam, mündete im Singlepath®*Campylobacter*-System.

So wurden 25 g feste Probe mit 225 ml Preston-Anreicherungsbouillon im Beutelwalkmischgerät homogenisiert und der Ansatz mikroaerophil bei 42 °C über 24 h bzw. 48 h im begasbaren Brutschrank bebrütet.

Vor Testbeginn wurde die einzeln in Alufolie verpackte und im Kühlschrank gelagerte Testeinheit der Verpackung entnommen und auf Raumtemperatur gebracht.

Circa 5 ml der 24 h und 48 h bebrüteten Anreicherungsbouillon wurden analog des Singlepath®*Campylobacter*-Protokolls zunächst in einem Erhitzungsschritt im Wasserbad 15 Minuten gekocht. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Probenflüssigkeit wurde durch eine doppelte Lage Gazestreifen gefiltert und 160 µl Suspension mit einer Pipette (Fa. Eppendorf) in die runde Öffnung der Testvorrichtung getropft.

Nach 20 Minuten wurde das Testergebnis ausgewertet:

Der Test war gültig, wenn innerhalb von 20 Minuten in der Kontrollzone (C) eine eindeutig rotgefärbte Linie erschien. Eine Probe wurde als *Campylobacter*-positiv bewertet, wenn in der Testzone (T) und in der Kontrollzone (C) innerhalb von 20 Minuten eindeutige rotgefärbte Linien erschienen. Eine Probe wurde als *Campylobacter*-negativ bewertet, wenn innerhalb von 20 Minuten in der Testzone (C) keine Linie erschien und in der Kontrollzone (C) eine eindeutig rotgefärbte Linie angezeigt wurde.

3.3.5 Molekularbiologischer Nachweis von *Campylobacter* spp.

Für den molekularbiologischen Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. aus Proben von frischem und gefrorenem Geflügelfleisch und Geflügelinnereien aus dem Berliner Einzelhandel sowie aus Geflügelkotproben wurde die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) verwendet. Zur Anwendung kam ein Verfahren, welches durch die Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden – Mikrobiologie“ der Kommission zur Durchführung des § 35 LMBG als vorläufige § 35-Methode zum Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln durch die PCR veröffentlichte (Anonymus, 2000). Es begründet sich auf die Methode nach OYOFO et al. (1992).

Die Aufarbeitung der Proben, wie auch die Isolierung, Identifizierung und abschließende Bestätigung präsumtiver *Campylobacter*-Kolonien wurden in Anlehnung an die Internationale Norm ISO 10272 durchgeführt (siehe 3.3.3).

Für die Beschreibung des Probenansatzes der verschiedenen Probenmatrizes wird auf das Unterkapitel 3.2. verwiesen.

Die bei der PCR gewonnenen spezifischen Amplifikate wurden abschließend stichprobenartig verifiziert (siehe unter 3.3.6).

Gewinnung bakteriellen Zentrifugats

Ziel war die Gewinnung bakterieller *Campylobacter*-DNA aus den oben beschriebenen Proben nach einem Anreicherungs-schritt.

Verwendung fand die 24 h und 48 h bebrütete Anreicherungsflüssigkeit nach PRESTON aus den Versuchsansätzen für die immunologischen bzw. klassisch-kulturellen Nachweismethoden. Je Probe wurden zweimal zwei ml dieser angereicherten Probenflüssigkeit zur weiteren Aufbereitung in jeweils ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Deckel (Fa. Eppendorf, engl. Tube) pipettiert. Anschließend wurde bei 8.000x g über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment einer der Proben als Rückstellprobe bei -20 °C gelagert. Das Zentrifugat der zweiten Probe wurde für die DNA-Isolation weiterverwendet.

Für die Gewinnung von DNA der Referenzstämme *Campylobacter jejuni* (DSM 4688^T), *Campylobacter lari* (DSM 11375^T) und *Campylobacter coli* (DSM 4689^T) wurde Koloniematerial von MHB-Agarplatten mit Peptonwasser (Fa. MERCK) aufgeschwemmt und 1 Minute bei 8.000x g im Eppendorf-Tube zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde für die anschließende Nukleinsäure-Präparation verwendet.

Nukleinsäure-Präparation

Die Probenaufbereitung für die PCR erfolgte mit dem QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Fa. QUIAGEN) entsprechend den Herstellerangaben. Das Protokoll für die „Isolation von bakterieller DNA aus Stuhlproben“ wurde angewendet und bestand dabei aus folgenden wesentlichen Schritten:

1. Suspendieren des im vorherigen Schritt gewonnenen Zentrifugats;
2. Lysieren der Bakterien und Freisetzung der bakteriellen DNA aus dem Zellkern in ASL Puffer bei +70 °C Inkubationstemperatur im Wasserbad;
3. Aufreinigung der Nukleinsäure durch die Adsorption von eventuell die PCR inhibierenden Substanzen über eine InhibitEX®-Tablette;
4. Fällung der Nukleinsäure;
5. Spezifische Bindung der Nukleinsäure an eine Silikamembran und Entfernung von Puffer über Zentrifugationsschritte;
6. Abschließende Elution der Nukleinsäure.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer temperierbaren Zentrifuge (Fa. Sigma) bei +16 °C und 20.000x g durchgeführt. Zur längeren Aufbewahrung wurde das Eluat bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikationsreaktion der PCR-Methode mit dem Primerpaar pg50 und pg3 wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro PCR-Reaktionsansatz durchgeführt. Es wurden jeweils Positiv-, Negativ- und Reagenzienkontrollen mitgeführt. Die DSM-Referenzstämme *Campylobacter coli* (DSM 4689^T) und *Campylobacter jejuni* (DSM 4688^T) wurden als Positivkontrollen, als Negativkontrolle wurde der Stamm *Campylobacter lari* (DSM 11375^T) gewählt. Die Reagenzienkontrolle enthielt alle verwendeten Reagenzien außer die Template-DNA. Die Methodenvorschrift gliederte sich in folgende Schritte:

1. Herstellung des Mastermixes und anschließende Zugabe der thermostabilen DNA-Polymerase sowie der extrahierten DNA (Template);
2. Amplifikation eines DNA-Abschnittes durch das Primerpaar pg50/pg3 innerhalb des definierten Temperatur-Zeit-Programms im Thermocycler;
3. Gelelektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung der PCR-Produkte (Amplifikate).

Herstellung des Mastermixes: Die Reagenzien wurden während der Vorbereitung des PCR-Ansatzes im Eisbad aufbewahrt. Der Mastermix wurde unter Zugabe von sterilem Wasser, 10fach konzentrierter PCR-Pufferlösung, MgCl₂-Lösung, Desoxynucleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)-Lösung (dNTP-Lösung) und den Primern pg50 und pg3 unter der

Sicherheitswerkbank (Fa. Heraeus Instruments) hergestellt. Die Tabelle 17 beschreibt in welcher Reihenfolge, Menge und Endkonzentration die Lösungen für die PCR pro Ansatz für den Mastermix pipettiert wurden. Dabei fanden die 1fach konzentrierte PCR-Pufferlösung (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3], GeneAmp® 10x PCR Buffer II, Fa. Perkin-Elmer, Applied Biosystems, USA), die MgCl₂-Lösung (1,5 mM/Endkonzentration, Fa. Perkin-Elmer), die dNTP-Lösung mit den Nucleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP, dTTP (0,2 mM/Endkonzentration je dNTP, Fa. Perkin-Elmer), die Primer pg50 und pg3 (0,5 µM/Endkonzentration, 18-mer, 10,0 OD, HPLC gereinigt, Fa. TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) sowie die thermostabile Hot start DNA-Polymerase mit einer Endkonzentration von 1,5 U/25 µl Ansatz (AmpliTaq Gold®, Fa. Perkin-Elmer) Verwendung.

Die lyophilisierten Primer pg50 und pg3 wurden zur Herstellung von Stammlösung auf eine Konzentration von 50 µM (50 pmol/µl) mit A. bidest. (autoklaviert, ultrafiltriert, pH 7,0) eingestellt und aliquotiert.

Das Oligonukleotid pg50 besitzt die Sequenzen 5'ATG GGA TTT CGT ATT AAC-3', die Basensequenz des Oligonukleotid pg3 ist 5'-GAA CTT GAA CCG ATT TG-3'.

Amplifikation im Temperatur-Zeit-Programm: Der Mastermix ist nach obigem Pipettierschema angemischt worden und wurde in einzelne Ansätze zu je 24 µl in Mini-Tubes (50 µl, Fa. Eppendorf) aufgeteilt. In die Probenansätze wurden jeweils 1 µl Template außerhalb der Sterilbank hinzupipettiert (10 µl-Pipette, Fa. Eppendorf). Für die Positiv- und Negativkontrollen war dies die jeweilige *Campylobacter*-DNA-Lösung, bei der Reagenzienkontrolle wurde nur 1 µl Wasser hinzugegeben. Die Reaktionsansätze wurden ohne Zeitverzug in den Thermocycler (Typ 9600, Fa. Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) überführt und das Temperatur-Zeit-Programm wurde gestartet.

Im Temperatur-Zeit-Programm wurde die doppelsträngige DNA initial bei 94 °C über 12 Minuten denaturiert. Es schlossen sich 40 Zyklen mit einer Denaturierungs-Phase bei 94 °C über 30 Sekunden, einer Annealing-Phase bei 42 °C über 60 Sekunden und einer Elongations-Phase bei 72 °C über 30 Sekunden an. Die finale Elongations-Phase (Endverlängerung) bei 72 °C über 5 Minuten und eine Kühlung der Probe auf 4 °C beendete das Temperatur-Zeit-Programm.

Gelelektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung der PCR-Produkte: Der vorrätig gehaltene 10-fach konzentrierte TBE-Puffer (0,89 M TRIS, Fa. Merck®, 0,89 M Borat, Fa. Calbiochem®, 0,02 M EDTA, Fa. Merck®; H₂O_{bidest.} ad 1000 ml; eingestellt auf [pH 8,0] mit 1 M bzw. 0,1 M HCl, Fa. Merck) wurde zunächst unter Zugabe von A. bidest. im Verhältnis 1:9 als Einfachpuffer hergestellt. Die finale Agarose-Konzentration (Fa.

BioWhittaker Molecular Applications) wurde dann unter Verwendung des 1-fach konzentrierten TBE-Puffers auf 2 % eingestellt. So wurde die Agarose zunächst nach schrittweiser, dosierter Zugabe des Pulvers zum TBE-Puffer und unter ständiger Röhreinwirkung des beheizbaren Magnetrührers (Fa. Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG) durch die Temperaturzuführung nach etwa 10-15 Minuten vollständig gelöst. Anschließend wurde das Gel in der Schottflasche für 5-10 Minuten in ein 54 °C temperiertes Wasserbad gestellt und langsam abgekühlt.

Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und nach Erstarren nach ca. 20 Minuten für weitere 10 bis 15 Minuten, abgedeckt mit 1-fach TBE-Puffer, in den Kühlschrank gestellt.

In ein 1,5 ml Tube (Fa. Eppendorf) wurden 5 µl Gel-Loading-Puffer BPB (Bromphenolblau-Stammlösung: 15ml 15%iges Ficoll[®] 400 (Fa. Pharmacia) in A. bidest. mit 0,25 ml 5%igem BPB in Tris-EDTA-Puffer) vorgelegt und 10 µl Amplifikat hinzupipettiert. Der Ladder wurde mit 6 µl DNA-Gewichtsmarker (DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 bp, 50 µg ≅ 1 A260 Unit, Fa. Boehringer/Roche Diagnostics GmbH), 16 µl A. bidest. und 5 µl Gel-Loading-Puffer BPB hergestellt.

Das erstarrte Gel wurde in die mit 1-fach TBE-Puffer befüllte Elektrophorese-Gelkammer (Typ Agagel G 45-0, Fa. Biometra bio-medizinische Analytik GmbH, Göttingen; Typ Pharmacia GNA 200, Fa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) gelegt und die Kammern mit 10 µl BPB-Amplifikat-Lösung sowie mit 13 µl BPB-Ladder-Lösung befüllt. Die verwendeten Elektrophorese-Netzgeräte (Fa. CONSORT, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) erzeugten eine Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand (50-150 V / 400 mA / 100 W). Eine Kühleinheit mit Pumpe sorgte für die Abfuhr von entstehender Wärmeenergie, so dass gleichbleibend niedrige Temperaturen in der Kammer und im Gel gehalten werden konnten. Je nach erforderlicher Laufstrecke betrug die Laufzeit im Gel ca. 2,5 Stunden.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese im Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) 10-20 Minuten gefärbt und anschließend 20-30 Minuten in H₂O_{dest.} entfärbt.

Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden abschließend über ein computergesteuertes Dokumentationssystem (Bio-Print[®], Computer-Software BIO-Capt[®], Fa. Vilbert Lourmat) im UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel als Foto in digitaler Form archiviert.

Eine Auswertung der erhaltenen Fragmente wurde durchgeführt. Die spezifischen Amplifikate für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* besitzen bei Verwendung des Primerpaares pg50/pg3 eine Fragmentlänge von ~450 bp.

Tabelle 17: Pipettierschema für den PCR-Ansatz

Komponenten	Menge [$\mu\text{l}/\text{Ansatz}$]	Endkonzentration
1. $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	16,7 (17 μl – x zugesetzten thermostabilen Polymerase)	
2. PCR-Pufferlösung II (10fach, Fa. Perkin-Elmer)	2,5	1-fach (50 mM ^a KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,3])
3. MgCl_2 -Lösung (25 mM, Fa. Perkin-Elmer)	1,5	1,5 mM/l
4. dNTP-Mix ^b (Fa. Perkin-Elmer)	jeweils 0,5	0,2 mM/l je dNTP
5. Primer pg50 (Fa. TIB MOLBIOL)	1,25	0,5 μM^{a} /l
6. Primer pg3 (Fa. TIB MOLBIOL)	1,25	0,5 $\mu\text{M}/\text{l}$
7. Thermostabile DNA-Polymerase, 5 U/ μl (Ampli Taq Gold™, Fa. Perkin-Elmer)	0,3	1,5 U ^c /25 μl Ansatz 0,06 U/ μl

a: Molare Konzentrationen: Mikromol/Liter [$\mu\text{M}/\text{l}$] oder [$\mu\text{mol}/\text{l}$], Millimol/Liter [mM/l] oder [mmol/l]

b: Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP

c: Unit [U] = Internationale Einheit [IE]; 1 Unit katalysiert die Inkorporation von 10 nmol Nukleotiden in ein säureunlösliches Produkt in 30 Minuten bei 70 °C; $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$: A. bidest.

Die Auswertung der PCR wurde entsprechend dem folgenden Schema vorgenommen:

Spezifisches Amplifikat	Amplifikationskontrolle	Ergebnis der PCR
positiv	positiv	positiv
negativ	positiv	negativ
negativ	negativ	nicht auswertbar

Die Negativkontrolle musste immer negativ sein, ansonsten galt das Ergebnis als nicht auswertbar.

Campylobacter jejuni und *Campylobacter coli* galten als nachgewiesen, wenn in der PCR ein spezifisches Amplifikat entstand. Eine Verifizierung des Amplifikats wurde über eine Real-Time PCR vorgenommen.

3.3.6 Verifikation von PCR-Amplifikaten

Ausgewählte Proben, die in der gelelektrophoretischen Auftrennung unspezifische, unscharf abgegrenzte Banden, oder augenscheinlich auf Höhe der Positivkontrollbande befindliche Amplifikationsbanden aufzeigten, wurden zusätzlich über die Multiplex-Realtime-PCR verifiziert (Gerätetyp Applied Biosystems ABI Prism® 7900HT).

Dabei basiert das Protokoll auf die Methode nach BEST et al. (2003). Primer mapA (*Campylobacter jejuni*) und ceuE (*Campylobacter coli*) sind von der Firma Sigma® Genosys (Germany) bezogen.

Die Verifikation wurde von der Molekularbiologischen Abteilung des Landesamtes für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (LSGV Saarbrücken) durchgeführt.

3.3.7 Quantitative Bestimmungen der Begleitkeime im Modellbrät

Vorab der Dotierung mit *Campylobacter* spp. wurde die Geflügelfleischmatrix auf ausgewählte Begleitkeime untersucht. Dazu wurden zwei Proben zu je 10 g dem Versuchsansatz (Gesamtmasse 2000 g) entnommen und über einen Homogenisierungsschritt in Peptonwasser (0,1% gepuffert mit Agar-Zusatz; PW 5, Fa. DIFCO) 1:10 verdünnt. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10^{-6} in Peptonwasser angelegt und auf den für die jeweilige Keimart spezifischen Selektivnährböden (siehe auch Anhang A) im Tropfplattenverfahren aufgebracht. Jede Probe wurde quantitativ im Doppelansatz auf folgende Keime bzw. Keimgruppen untersucht:

Neben der mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl auf Plate-Count-Agar (PC-Agar, Fa. OXOID), den *Enterobacteriaceae* auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach MOSSEL (VRBD-Agar, Fa. MERCK), den Laktobazillen auf Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS-Agar, Fa. MERCK), den Pseudomonaden auf Pseudomonaden Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein (Glutamat Stärke Phenolrot-Agar; GSP-Agar, Fa.

MERCK) wurde mit Citrate Azide Tween Carbonate Agar (CATC-Agar, Fa. MERCK) auf Enterokokken und mit Selektivagar nach BAIRD – PARKER (Baird-Parker-Agar, Fa. Oxoid) auf Mikrokokken und *Staphylococcus aureus* untersucht.

Die angewandten Methode, Bebrütungskonditionen und Auswertung für den jeweiligen Nährboden sind aus Tabelle 18 ersichtlich.

Die Nährböden wurden in einem programmierbaren Kühlbrutschrank bebrütet (Fa. Heraeus). Die Herstellung der speziellen Gasatmosphäre für *Enterobacteriaceae* wurde über einen Anaerobiertopf mit BBL GasPak Anaerobic™-System der Fa. Becton Dickinson erreicht. Ebenso wurden die Laktobazillen im Topf, jedoch mit dem Gasentwickler-Kit Anaerocult® C der Fa. MERCK, bebrütet.

Die Berechnung der Kolonie bildenden Einheit (KbE) pro Gramm Geflügelfleischmatrix erfolgte durch die Formel nach FARMIOE (FARMIOE et al., 1954) als gewogenes arithmetisches Mittel.

3.3.8 Stammhaltung

Campylobacter spp. Isolate aus den Lebensmittel- und Geflügelkottupferproben wurden in ein Stammhaltungssystem überführt und bei -80 °C im Tiefkühlschrank (Fa. GFL) gelagert. Die Überführung von *Campylobacter*-Isolaten in das Stammhaltungssystem wurde auf zweierlei Weise durchgeführt:

a. Stammhaltung auf Bouillon: Die bebrütete Brucella-Bouillon (siehe 3.3.3) wurde im Verhältnis 1:10 mit 99,5%igem sterilem Glycerin (Fa. MERCK) versetzt und gut gemischt. In ein steril vorbereitetes Glasröhrchen, zu 3/4 mit kleinen Glasperlen befüllt, wurde von dieser Kultur bis zu knapp 1ml hinein pipettiert. Die obersten Perlen waren dabei lediglich benetzt. Das Röhrchen ist mit einem Schraubverschluss verschlossen und mit einem Etikett versehen in einem Kunststoff-Kästchen bei -80°C eingelagert worden.

b. Stammhaltung auf Mikrobank:

Die Mikrobank-Röhrchen des Cryobank™-Systems (Fa. Mast Diagnostika) enthielten behandelte Kügelchen in einem hypertonen Spezialmedium, an deren Oberfläche sich die Mikroorganismen banden. Beimpfung wurde entweder vom festen Nährmedium mittels Ösenabstrich oder mit einem Aliquot der Flüssigkultur. Das Röhrchen wurde verschlossen und vier bis fünf Mal vorsichtig mit der Hand geschüttelt. Anschließend wurde das Spezialmedium mit einer sterilen Pipette vollständig entfernt. Das Gefäß wurde erneut verschlossen, beschriftet und bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 18: Methoden für die Bestimmung der Begleitkeime auf Standard- und Selektivnährböden

Methoden	Zielkeim	Nährmedium	Bebrütungs- Temperatur [°C]	Bebrütungs- dauer [h]	Atmosphäre	Koloniemorphologie
DIN 10161 § 35 LMBG (L 06.00-19)	mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	PC-Agar	30	72	aerob	alle
§ 35 LMBG* (L 06.00-25)	<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG-Agar	30	48	anaerob	rote Kolonien mit rotvioioletten Präzipitathof
DIN 10161, 10168 § 35 LMBG* (L 06.00-31)	<i>Lactobacillaceae</i>	MRS -Agar	30	72	mikroaerob	alle Kolonien
DIN ISO 13720* § 35 LMBG* (L 06.00-43)	<i>Pseudomonadaceae</i>	GSP-Agar	25	24 - 72	aerob	blau-violette Kolonien auf rot-vioiolettem Nährboden
DIN 10106*, 10161 § 35 LMBG* (L 06.00-32)	<i>Enterococcus</i>	CATC -Agar	37	24 - 48	aerob	dunkelrote Kolonien
§ 35 LMBG* (L 06.00-22)	<i>Micrococcus</i> / <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	BP-Agar	37	48	aerob	braun- schwarze Kolonien = Mc.; schwarze mit Präzipitathof = <i>St. aureus</i>

Staphylococcus (St.); *Micrococcus* (Mc.); Plate Count-Agar (PC-Agar); Staphylokokken-Selektivagar nach Baird – Parker (BP-Agar); Citrate Azide Tween Carbonate Agar (CATC-Agar) nach BURKWALL und HARTMANN (1964), modifiziert von REUTER (1968); Glutamat Stärke Phenolrot-Agar (GSP-Agar) nach KIELWEIN (1969); *Lactobacillus*-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar); Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel (VRBD-Agar); *Campylobacter*-Agar nach Karmali (CAK-Agar); *) in Anlehnung, da kein Pflichtnährboden und/oder Bestätigungsreaktionen reduziert durchgeführt wurden

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in Anlehnung an die Arbeitsvorschrift nach dem Norm-Entwurf EN ISO 16140 (2003a) sowie in Anlehnung an SACHS (1991) und LORENZ (1992). Dabei wurde unter anderem mittels Vierfeldertafel und das entsprechende Formelwerk die Sensitivitäten, Spezifitäten, positive und negative prädiktive Werte, Übereinstimmungsgrade und die Konkordanzindices (Kappa) bestimmt. Signifikanzen wurden über den McNemar-Test und Chi-Quadrat Test (Vierfeldertest) berechnet.