

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei neue immunologische und ein molekularbiologisches Verfahren für den Nachweis von thermophilen *Campylobacter* in verschiedenen Zielmatrizes auf ihre Praxistauglichkeit hin zu untersuchen.

Die Möglichkeit ihres Einsatzpotentials als Schnellmethode in der Routinediagnostik wurde überprüft und abschätzbar gemacht. Dabei sind vergleichende Untersuchungen der alternativen Nachweisverfahren gegenüber dem etablierten klassisch-kulturellen Verfahren durchgeführt worden.

Kardinale, praxisrelevante Validierungsparameter wurden genutzt, um von den verschiedenen Nachweissystemen Messdaten für eine subjektive Beurteilung und Bewertung zu erhalten.

5.1 Inklusivitäts- und Exklusivitätsstudie

5.1.1 Immunologische Testsysteme

Die Spezifitätsmessungen im GLISA und ELFA lieferten bei allen Zielkeimen positive Testsignale im jeweiligen System. Alle anderen Non-*Campylobacter*-Stämme führten in den Systemen zu negativen Ergebnissen.

Hohe Keimdichten von $1,1 \times 10^8$ KbE/ml (*Campylobacter lari*), $1,4 \times 10^8$ KbE/ml (*Campylobacter jejuni*) und $1,8 \times 10^8$ KbE/ml (*Campylobacter coli*) führten zu positiven Testresultaten.

Da beide immunologische Nachweissysteme neben den Zielkeimen auch bei anderen *Campylobacter*-Spezies positive Testresultate lieferten, ist festzuhalten, dass eine selektive Anreicherung bei 42 °C für den höchstmöglichen Wachstumsausschluss von nicht-thermophilen *Campylobacter*-Spezies, z. B. *Campylobacter fetus*, unabdingbar ist. Eine Wachstumshemmung von Nicht-Zielkeimen ist jedoch über die ausschließliche Nutzung höherer Bebrütungstemperatur (≥ 37 °C) auch aufgrund des Vorkommens von thermotoleranten *Campylobacter fetus* Keimen nicht gänzlich auszuschließen. Thermotolerante Keime dieser Spezies sind schon aus Milch isoliert worden (TAUXE et al., 1988).

Campylobacter upsaliensis wie *Campylobacter fetus* lieferten positive Testergebnisse als Reinkultur in beiden immunologischen Systemen.

Scheinbar wird über die Anreicherung und Ausstrich auf Selektivagar nach Karmali der Koloniewuchs dieser Nicht-Zielkeime gehemmt (siehe Kapitel 4.1, Tabelle 19).

Im engeren Sinne sind jedoch damit falschpositive Ergebnisse (Nicht-Zielkeime) im ELFA System nicht gänzlich auszuschließen, da ein Wachstum von Nicht-Zielkeimen mit den oben genannten Selektivfaktoren nicht vollständig verhindert werden kann.

In der Diagnostik ist jedoch auch der Nachweis von anderen *Campylobacter* Spezies (z. B. *Campylobacter upsaliensis*) wünschenswert. Eine abschließende biochemische Speziesdifferenzierung der Isolate bleibt aber notwendig. Seitens des Herstellers wird immer eine kulturelle Bestätigung positiver Testergebnisse auf Selektivmedien nach ISO 10272 vorgeschrieben.

Das GLISA Protokoll benennt keine speziellen thermophilen *Campylobacter* Spezies als Zielkeime des Testsystems. Die Inklusivitätsstudie zeigt jedoch auf, dass neben *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* und *Campylobacter lari* auch *Campylobacter fetus* und *Campylobacter upsaliensis* positive Resultate lieferten. Dies deckt sich mit von THOMPSON et al. (2004) beschriebenen vorläufigen Ergebnissen der Evaluierungsstudie der AOAC (Research Institute *Performance Tested Methods* Program). Es wurde darüber hinaus in dieser Studie festgestellt, dass auch *Campylobacter sputorum* positive Resultate lieferte.

Ebenso gehen die Ergebnisse der AOAC-Exklusivitätsstudie mit den vorliegenden Resultaten dieser Arbeit konform (THOMPSON et al., 2004). So wird beispielsweise *Arcobacter* spp., der Familie der *Campylobacteraceae* zugehörig und ebenfalls als ein wichtiger humaner Enteritiserreger bekannt (WESLEY, 1996), von keinem der Systeme detektiert. Bei anderen Genera (*Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* etc.) traf dies ebenso zu.

Die immunologischen Nachweissysteme erfüllen die Erwartungen der Inklusivitäts- sowie Exklusivitätsstudie.

5.1.2 Molekularbiologisches Testsystem

Eine Inklusivitäts- sowie Exklusivitätsstudie wurde im Falle der angewandten PCR mit dem Primerpaar pg3/pg50 nicht durchgeführt. Es wird auf die Ergebnisse zur Spezifitätsmessung von OYOFO et al. (1992) verwiesen.

Die Primer pg3/pg50 waren in der Studie von OYOFO et al. (1992) nicht in der Lage, detektierbare PCR Produkte unter anderem folgende stammverwandte Spezies zu generieren:

Arcobacter cryaerophilus, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter butzleri*.

5.2 Nachweis von *Campylobacter* spp. in nativ kontaminierten Proben

5.2.1 Schlachthofproben

Hohe Nachweisraten in den Kottupferproben (n = 161) von Puten aus vier Mastbetrieben waren zu verzeichnen. Sowohl der kulturelle (98 % positive Proben), immunologische (98 % positive Proben) als auch molekularbiologische (99 % positive Proben) Nachweis weist auf eine hohe *Campylobacter*-Belastung der Herden hin. Andere Autoren stützen diese Befunde der hohen *Campylobacter*-Belastung von Geflügelherden (LIENAU, 2004), wobei sich aber wenige Daten auf Puten beziehen (LUECHTEFELD und WANG, 1981, 1982; AHO und HIRN, 1988; SCHROT, 1990; WEDDERKOPP et al., 2001; REITER et al., 2005).

Über das Vorkommen von *Campylobacter* spp. bei verschiedenen Tierarten fanden LUECHTEFELD und WANG (1982) die höchste Isolationsrate bei Puten. Bei SCHROTH (1990) erwiesen sich 81,1 % der untersuchten Mastputenbetriebe als *Campylobacter*-positiv.

Alle Testsysteme erwiesen sich beim Nachweis von *Campylobacter* spp. aus Kotproben als valide, wobei die höchste Nachweisrate über das molekularbiologische Verfahren ermittelt wurde. In den verschiedenen Systemen konnten bezüglich der ermittelten Nachweisraten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Ein marginales Problem bestand in der kulturellen Bestätigung zweier präsumtiv-positiver ELFA-Resultate (positiver TW-Wert). Hier muß das abschließende Gesamtergebnis dieser beiden Proben „*Campylobacter*-negativ“ lauten, da eine kulturelle Bestätigung durch Überwucherung der Nährbodenoberfläche mit Begleitkeimen nicht erbracht werden konnte.

BORCK et al. (2001) stellten erste Ergebnisse vergleichender Untersuchungen zwischen zwei immunologischen Tests (u. a. das ELFA-System miniVIDAS), einer PCR, und weiteren klassisch-kulturellen Systemen vor. Probenmaterial war, wie in der hier vorliegenden Studie, Kot vom Truthahn. Das ELFA-System zeigte in den Untersuchungen von BORCK et al. eine hohe Sensitivität (94 %) und Spezifität (97 %) gegenüber des dortig zugrunde gelegten Goldstandards. Auch in der hier vorliegenden Studie erwies sich das ELFA-Verfahren gegenüber der Referenzmethode für den Nachweis von *Campylobacter* spp. aus Kotproben mit einer Sensitivität von 100 % als valide.

Auch REITER et al. (2005) verwendeten das miniVIDAS[®]-System mit Erfolg und erzielten hohe Nachweisraten in Eingeweide- und Gallenblasenproben vom Geflügel.

Die Spezifität im ELFA war hier wegen zu geringer Probenergebnisse nicht ermittelt worden (siehe Kapitel 4.4.2 und 5.3). So wären weiterführende Untersuchungen an der Probematrix „Kot“ wünschenswert. Prävalenzstudien über das Vorkommen von *Campylobacter* spp. in

Putenbeständen und im Lebensmittel könnten näher erfasst werden und hohe Probendurchsätze sind dann mit Hilfe des halbautomatisierten ELFA-Systems möglich.

5.2.2 Lebensmittelproben

Die in den untersuchten 490 lose und verpackten Geflügelproben ermittelte hohe Nachweisrate an thermophilen *Campylobacter* spp. wird auch durch Veröffentlichungen vieler anderer Autoren gestützt (LOEWENHERZ, 1995; KRAMER et al., 2000; PEZZOTTI et al., 2003). Damit stellen Produkte vom Geflügel, Geflügelfleisch und –innereien, weiterhin ein mit *Campylobacter* spp. hoch belastetes Lebensmittel dar. Ein Vergleich der eigenen Resultate mit anderen Literaturangaben wird jedoch dadurch erschwert, dass den Erhebungen oftmals unterschiedliche Untersuchungsmethoden zugrunde liegen.

Die *Campylobacter*-Nachweisraten in den vorliegenden Resultaten differierten bezüglich ihres Probenzustandes (frisch/gefrorene Proben) erheblich voneinander ($\chi^2 = 20,5$). Aus frischen Geflügelproben (n = 371) ließen sich signifikant mehr *Campylobacter*-Keime isolieren (63,1 %) als aus gefrorenen Produkten (n = 119) mit einem Anteil von 39,5 % *Campylobacter*-positiver Proben. Dies wird durch die Arbeiten der Gruppe DUFRENNE et al. (2001) bestätigt, die in gefrorenen Geflügelschlachtkörpern ebenso niedrige *Campylobacter*-Funde nachwiesen. Auch BRECHTEL et al. (2002) erzielten niedrige Nachweisraten bei tiefgefrorenen Geflügelfleischprodukten (n = 200). Dabei erwies sich das Produkt „Geflügel, gefroren-roh“ mit einer Isolierungsrate von 15,7 % als am höchsten belastet.

Sicherlich spielen für die niedrigen Isolationsraten die Einnahme des VBNC-Status von *Campylobacter* spp. eine entscheidende Rolle, die eine Kultivierung erschwert. Aber auch der Einfrierprozess als solches ließ vermutlich viele *Campylobacter*-Keime absterben (HUMPHREY, 1986; BHADURI und COTTRELL, 2004). Natürlich ist auch die Isolierungsmethode an sich kritisch zu betrachten. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Campylobacter* spp. über die ISO 10272 führten schon OPFER et al. (2000) durch.

Es gibt mehrere Erklärungsansätze und es kann nur darüber spekuliert werden, wie und warum die Nachweisrate aus gefrorenen Proben in der hier vorliegenden Studie niedriger ausfiel.

Es bleibt an dieser Stelle die Aussage unbegründet, ob frische, gekühlte Geflügelprodukte tatsächlich signifikant höher belastet sind als gefrorene Produkte. Von der Isolationsrate ist jedoch abzuleiten, dass frische, gekühlte Proben mehr viable Keime als die gefrorene Produktgruppe beherbergen. Dies wird auch in Versuchen von BAUMGARTNER et al. (1995)

im Falle von frischen und gefrorenen Geflügellebern bestätigt. Tiefgefrieren reduziert offensichtlich die Nachweisrate (STERN und KAZMI, 1989; LEE et al. 1998; ZHAO et al., 2002). TOMANCOVA et al. (1991) stellten hingegen fest, dass Gefrieren partielle Auswirkungen auf die Zellfunktion besitzt und *Campylobacter jejuni* bis zu 2 bis 8 Wochen überleben kann.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen sind Fleisch und Innereien der Tierart Pute und Hähnchen in gleicher Weise stark belastet. Dabei unterschied sich die *Campylobacter*-Isolationsrate aus den Innereien nicht signifikant von der des Fleisches.

Eine Erklärung dafür ist die durch andere Autoren beschriebene mögliche Kreuzkontamination während des Schlachtprozesses, wobei es zu Schmierkontaminationen kommt. Zunächst unbelastete Innereien und Fleisch werden durch den Eviszerationsprozess mit *Campylobacter* spp. kontaminiert (LIENAU, 2004; BERNDTSON et al., 1992).

Die Leberproben waren mit 57,5 % (61 positive/106) überdurchschnittlich stark belastet. Auch CHRISTOPHER et al. (1982) und URSINITSCH et al. (2001) stellten mit 50 % bzw. 66 % *Campylobacter*-positiver Proben eine hohe Belastungen dieses Produktes fest. OOSTEROM et al. (1983) gaben Überlebenszeiten von *Campylobacter* spp. in Hähnchenlebern von 12 Wochen bei -20 °C an, was diese Isolationsrate unter anderem erklären ließe.

Wenige vergleichende Untersuchungen sind für Produkte der Tierart Pute und Hähnchen in der Literatur beschrieben worden. KWIATEK et al. (1990) fanden in Geflügelprodukten von der Pute in nur 3 % aller untersuchten 236 Gesamtproben *Campylobacter* spp.. Proben vom Huhn waren auch hier jedoch mit 80,3 % (n = 203) erheblich belastet.

Auch die Gruppe ZHAO et al. (2001) finden bezüglich Proben der Tierart Pute in nur 14 % der Fälle *Campylobacter* spp., wohingegen Proben vom Huhn ähnlich hoch belastet waren (70,7 %).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen hier eine deutlich andere *Campylobacter*-Isolationsrate aus Huhn- und Putenprodukten.

Die geringfügig höhere Isolationsrate aus Fleisch vom Huhn mit 56,1 % unterscheidet sich nicht signifikant von der Isolationsrate aus Puten-Fleisch mit 50,7 % ($\chi^2 = 0,57$). Zwischen den Isolationsraten aus Innereien von Pute und Hähnchen verhält es sich gleich ($\chi^2 = 0,49$).

Bei der Produktgruppe gefrorene Putenerzeugnisse wurden jedoch signifikant weniger *Campylobacter*-Keime isoliert als bei gefrorenen Hähnchenerzeugnissen ($\chi^2 = 4,77$). Beim frischen Angebotszustand liegt keine Signifikanz bezüglich der Isolationsraten zwischen Pute und Hähnchen vor.

Die Belastung innerhalb der Gruppe „gefrorener Putenprodukte“ lag in der vorliegenden Studie bei 28,0 %. RAYES et al. (1983) konnten aus 55 % tiefgefrorenen Truthahnflügeln *Campylobacter jejuni* isolieren.

5.3 Vergleich der Nachweissysteme

5.3.1 Sensitivitätsvergleich

Alle getesteten *Campylobacter jejuni*-, *Campylobacter coli*- und *Campylobacter lari*-Reinkulturen zeigten positive Reaktion im ELFA und GLISA. Auch hohe Keimdichten von über $>1,1 \times 10^8$ KbE/ml wurden in beiden Systemen positiv detektiert (siehe Kapitel 5.1).

Die festgestellten gerätespezifischen unteren Nachweisgrenzen des ELFA und GLISA Systems für die jeweilige Keimspezies decken sich mit Ergebnissen anderer Autoren für immunologische Tests. Je nach immunologischem System werden in anderen Quellen ähnliche Bereiche für die Nachweisgrenzen immunologischer Systeme genannt, die etwa bei 10^{3-6} KbE/ml liegen (COX et al., 1987; DE BOER und BEUMER, 1999; BUBERT et al., 2004).

Als untere Nachweisgrenze für das GLISA geben THOMSON et al. (2004) $10^5 - 10^6$ KbE/ml an, wobei $1,6 \times 10^6$ KbE/ml für eine deutlich positive rote Testzone notwendig sind.

BUBERT et al. (2004) stellten ein unteres Detektionslimit ab ca. 1×10^5 KbE/ml fest.

Ein vergleichbares Ergebnis zeigte auch die hier durchgeführte Studie mit $1,4 \times 10^6$ KbE *Campylobacter coli*/ml für das Testsystem.

Vergleichbare Angaben zur unteren Nachweisgrenze für das ELFA-System sind der Literatur nicht zu entnehmen.

Die Ergebnisinterpretation im GLISA wurde durch die subjektive Farbwahrnehmung in wenigen Proben erheblich erschwert. So führten niedrigere Keimdichten ($\leq 2,9 \times 10^5$ KbE *Campylobacter jejuni*/ml) zu keiner oder aber sehr schwachen Bande im GLISA, die nicht mehr als eindeutig rotgefärbte Linie erkennbar war und folglich das Ergebnis als negativ bewertet werden musste. Beim ELFA erfolgt die Interpretation durch die in das System integrierte automatische Fluoreszenzmessung und wird dokumentenecht schriftlich fixiert (Thermodrucker). Ergebnisdaten können auch elektronisch gespeichert werden und am Computer bearbeitet werden. Ein wichtiger Aspekt für das Qualitätsmanagementsystem akkreditierter Laboratorien mit hohem Probendurchsatz.

Die angewendete PCR, betrachtet als ein System, das dem molekularbiologischen Prinzipien unterliegt, erweist sich, wie im Abgleich mit den Ergebnissen anderer Autoren erwartet

(DEBOER und BEUMER, 1999), als sensitivste Nachweismethode. Immunologische Verfahren benötigen für den Nachweis deutlich höhere Keimkonzentrationen, von ca. zwei bis drei Zehnerpotenzen mehr Keimen pro Milliliter Probenvolumen.

Das Primersystem pg3/pg50 erwies sich beim Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* als sehr sensitiv, welches auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt wird (MÄDE und STARK, 2000; OPFER et al., 2001).

So sind nach den vorliegenden Untersuchungen schon Keimkonzentrationen von $3,0 \times 10^3$ KbE *Campylobacter coli*/ml positiv erfassbar. *Campylobacter jejuni* wird bei einer Konzentration von $1,7 \times 10^4$ KbE/ml erfasst (arithmetisches Mittel). Die gerätespezifische Nachweisgrenze liegt somit deutlich niedriger als bei den immunologischen Verfahren.

Die zunächst hohe Sensitivität des PCR-Systems wird jedoch durch die Aufarbeitung der Probe limitiert. Bei der DNA-Extraktion muss mit Verlusten auch der Ziel-DNA gerechnet werden.

Eine Anreicherung der Lebensmittelproben ist bei der klassischen PCR zum Nachweis von *Campylobacter* spp. angebracht. Die in Lebensmitteln meist sehr niedrigen Zahlen von *Campylobacter* spp. können dann nachgewiesen werden (MÄDE und STARK, 2000). Auch die sehr geringe Infektionsdosis (ROBINSON, 1981) ist dabei zu bedenken. Vorhandene tote Bakterien werden durch die Anreicherung eventuell verdünnt (GIESENDORF et al., 1992).

Ebenso können enzymatische Vorgänge im Anreicherungs-Nährmedium die DNA toter Bakterien abbauen und folglich falschpositive Ergebnisse durch die PCR minimieren (MÄDE und STARK, 2000).

Um falsch-negative PCR-Ergebnisse ausschließen zu können wird vorgeschlagen, zukünftig neben den Negativ- und Positivkontrollen eine Interne-Kontrolle in jeder Probe mitzuführen. Die Herstellung einer solchen Kontrolle wird in der vorläufigen § 35-Methode beschrieben.

Vergleichende Angaben zur gerätespezifischen Nachweisgrenze für das Primersystem pg3/pg50 sind der Literatur nicht zu entnehmen. MÄDE und STARK (2000) führten zwar genau beschriebene Inokulationsversuche in Milch mit *Campylobacter coli* (DSM 4689) durch. Erfasst wird jedoch hier nur die minimale Keimkonzentration, die nach Anreicherung vom System noch positiv detektiert wird (methodenabhängige Nachweisgrenze: 1,4 KbE/ml). Eine Aussage wie hoch die tatsächliche *Campylobacter*-Konzentration in der Anreicherung war, wird nicht näher beschrieben.

5.3.2 Methodenabhängige Spezifität, Sensitivität, Übereinstimmungsgrad

5.3.2.1 Artifiziiell kontaminierte Proben

In allen drei Testsysteme traten bezüglich des Nachweises von *Campylobacter jejuni* im dotierten Fleischbrät keine Positivabweichungen auf (Spezifität 100 %).

Auch sind in allen drei Testsystemen wenige Negativabweichungen zu verzeichnen (GLISA 5, ELFA 3, PCR 1). Das ELFA stellte sich mit einer Sensitivität von 94,4 % als das validere der beiden immunologischen Systeme dar.

Den höchsten Übereinstimmungsgrad zur Referenzmethode besaß die PCR mit 98,6 %, wobei nur eine Negativabweichung in einer Probe (Nr. 12) im IX. Dotierungsversuch auffiel. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die jeweils vorliegende unterschiedliche Keimkonzentration in der verwendeten Anreicherung. Die Keimkonzentration der 24 h-Anreicherung ($2,1 \times 10^2$ KbE/ml) lag über der Nachweisgrenze des kulturellen Verfahrens, jedoch lag die Keimkonzentration der 48 h-Anreicherung noch unter der Nachweisgrenze des molekularbiologischen Verfahrens ($5,0 \times 10^3$ KbE/ml).

Untersuchungen von TRIGOT et al. (2002) zeigten gleichfalls hohe Werte in der Spezifität des miniVIDAS®-Systems (98,7 %). Ihre für dieses System ermittelte Sensitivität liegt bei hohen 100 %. Als Referenzverfahren wurde, wie in dieser Studie, die kulturelle Methode nach ISO 10272 verwendet.

Auch BUBERT et al. (2004) stützen diese Ergebnisse unter Verwendung von Reinkulturen und gaben eine Sensitivität und Spezifität zur parallel verwendeten kulturellen Methode (ISO 10272) mit jeweils 100 % an. Eine 100 %ige Übereinstimmung des ELFA zur ISO10272 wurde ermittelt, wobei nur 16 Proben eingesetzt wurden.

Es ist auch festzustellen, dass alle Systeme niedrigste *Campylobacter*- Keimkonzentrationen nachzuweisen vermögen. So konnte ermittelt werden, dass auch noch in der Versuchsreihe IX mit einer berechneten mittleren Konzentration von $4,1 \times 10^{-1}$ KbE/g Versuchsmatrix positive Testresultate durch die verschiedenen Methoden erzielt werden konnten (methodenabhängige Nachweisgrenze). BUBERT et al. (2004) gelang noch der Nachweis von 1-11 KbE in 25g artifiziiell kontaminiertem Geflügelhackfleisch nach Anreicherung im GLISA. In der vorliegenden Arbeit schnitt im IX. Dotierungsversuch der GLISA mit nur einer *Campylobacter*-positiv erfassten Probe von zwölf Proben am schlechtesten ab. Das ELFA folgte mit drei von zwölf und die PCR mit fünf von zwölf positiv detektierten Proben.

Erklären lassen sich diese Unterschiede durch die individuelle gerätespezifische Nachweisgrenze der verschiedenen Systeme. Dabei ist das molekularbiologische Nachweisverfahren am sensitivsten (98,2 %), gefolgt vom ELFA- (94,4 %) und GLISA-System (Sensitivität 90,7 %).

BUBERT et al. (2004a) ermittelten bezüglich des GLISAs im Vergleich zur kulturell biochemischen Methode eine hohe Spezifität bzw. Sensitivität von 98 % bzw. 100%.

Die in dieser Studie ermittelte Spezifität des GLISAs beträgt 100%.

Das molekularbiologische Verfahren besitzt den höchsten Übereinstimmungsgrad zum Referenzverfahren (98,6 %), dicht gefolgt von ebenfalls guten Ergebnissen der immunologischen Systeme (ELFA 95,8 % bzw. GLISA 93,1 %). In keinen der alternativen Verfahren wurde signifikant mehr Positiv- bzw. Negativabweichungen im Vergleich zum kulturellen Verfahren ermittelt.

Aufgrund der oben genannten Feststellungen stellt sich auch die Anreicherungsmethode als zuverlässig dar, da sie niedrige *Campylobacter jejuni* Konzentrationen in der Fleischmatrix anreichert. Nach 24-stündiger Bebrütung konnten in allen 12 Proben der Dotierungsklasse IX Keimkonzentrationen von über $1,6 \times 10^2$ KbE/ml quantitativ ermittelt werden, nach 48-stündiger Bebrütung über $1,0 \times 10^3$ KbE/ml.

Auffallend ist die unterschiedlich angestiegene Keimkonzentration nach 48-stündiger Bebrütungszeit. So gibt es Proben, die $1,2 \times 10^5$ bis $3,4 \times 10^6$ KbE/ml enthalten, wiederum andere Anreicherungsproben der gleichen Dotierungsklasse deutlich unter $1,0 \times 10^4$ KbE/ml besitzen. Nach 24-stündiger Bebrütung dieser Anreicherungen waren die Differenzen der Konzentrationen bedeutend geringer und beliefen sich auf unter einer 10er Potenz zwischen der Probe mit der niedrigsten und der Probe mit der höchsten Keimkonzentration.

Die verschiedenen Systeme erweisen sich als valide in Bezug auf den Nachweis von *Campylobacter jejuni* aus artifiziell kontaminiertem Versuchsbrät. Hohe Spezifitäten und Sensitivitäten waren bei allen Nachweissystemen zu verzeichnen.

Die Nachweissysteme sind annähernd als gleichwertig zu betrachten, mit geringfügigem, jedoch nicht signifikanten Vorteilen zugunsten des molekularbiologischen Verfahrens.

5.3.2.2 Nativ kontaminierte Proben (Feldproben)

Der *Campylobacter*-Nachweis aus natürlich kontaminierten Geflügelproben durch die verschiedenen Systeme (ELFA, PCR) zeigte korrelierende Resultate gegenüber dem Referenzverfahren (Übereinstimmungsgrad VIDAS-ISO 99,0 %, PCR-ISO 95,8 %).

Auffallend waren die durch hohe Begleitkeimflora entstandenen Positiv- bzw. Negativabweichungen im ELFA-System. So waren insbesondere die aus Gefügelkottupfer isolierte kokkoide Begleitkeimflora verantwortlich für eine Überwucherung der kulturellen Agarplatten und folglich konnte keine Auswertung stattfinden. Das ELFA-System wies jedoch mit hohem Testwert (TW-Wert) in diesen Proben eindeutig Ziel-Antigen nach.

Das ELFA zeigte hohe Sensitivitäten sowohl innerhalb der Gruppe der Lebensmittel (98,3 %) als auch bei den Kottupferproben (100 %). Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von KRADOLFER und BOUCHET (1998), die eine ermittelte Sensitivität von 98 % dem miniVIDAS® CAM-Assay zuschreiben.

KRADOLFER und BOUCHET (1998) gaben eine hohe Spezifität des ELFA-Systems an (100%). Die ermittelte Spezifität in dieser Studie ist vergleichbar hoch. In der Gruppe der Lebensmittel beträgt sie 99,0 %.

OPFER et al. (2001) ermittelten für die Methode nach OYOFO et al. (1992) eine Sensitivität von hohen 98 %. Die in der vorliegende Studie ermittelte Sensitivität liegt aufgrund dreier Negativabweichungen nur bei 95,2 %.

In der PCR spielte insbesondere die Primerspezifität eine Rolle und es konnten die in der kulturellen Methode als *Campylobacter lari* spezifizierten Keime in zwei Proben durch das Primersystem pg3/pg50 nicht erfasst werden.

Eine weitere Probe ist durch die PCR ebenfalls nicht erfasst worden, in der kulturell *Campylobacter coli* nachgewiesen wurde.

Um eine Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sind im Testlauf mitgeführte Positiv- und Negativkontrollen sowie die Verifikation der Amplifikate notwendig.

Obwohl *Campylobacter lari* in Produkten vom Geflügel deutlich seltener angetroffen wird als die beiden Hauptspezies *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, sollte in der Routinediagnostik der PCR-Nachweis stets kombiniert mit dem kulturellen Nachweis eingesetzt werden. Ob der Einsatz einer Multiplex-PCR mit zusätzlichem Primersystem zum Nachweis von *Campylobacter lari* sinnvoll ist, sollte von der Probenart und von dem Untersuchungsziel abhängig gemacht werden.

Bei der Interpretation der PCR-Ergebnisse ist zu bedenken, dass auch DNA toter Bakterien nachgewiesen wird. „Viable but nonculturable“ - Formen von *Campylobacter* spp. sollten jedoch nicht außer Acht gelassen werden, auch wenn nur die Kulturmethode mit dem Nachweis von lebenden Keimen für entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen zumeist ausschlaggebend bleibt. Mit der PCR erhält man jedoch wertvolle Aussagen über

epidemiologische Aspekte des Keims und kann im Sinne der Lebensmittelhygiene-Verordnung eine Rückverfolgung gewährleisten.

Keines der beiden Testsysteme (PCR, ELFA) zeigte im Vergleich zum Referenzverfahren signifikant mehr Positiv- bzw. Negativabweichungen.

Beide Methoden stellten sich im Routineverfahren bezüglich des Nachweises von *Campylobacter* spp. aus natürlich kontaminierten Lebensmittelproben (Geflügelfleisch und Geflügelinnereien) als zuverlässig dar.

Für die Spezifität des ELFA- und PCR-Systems in der Gruppe der „Kotproben“ kann eine abschließende statistische Bewertung nicht stattfinden. Zu gering waren die Probenzahlen, in denen keine *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden. Es wäre wünschenswert dieses Feld zukünftig näher zu beleuchten.

5.3.3 Gerätespezifische Nachweisgrenze

5.3.3.1 ELFA-System

Die hier ermittelte gerätespezifische Nachweisgrenze unter Verwendung einer artifiziell kontaminierten Bouillon entspricht vergleichbaren immunologischen Systemen, auch wenn der direkte Vergleich zu Untersuchungsergebnissen anderer Autoren aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen in den Nachweissystemen, z. B. unterschiedlich verwendete Einmischmatrix und *Campylobacter*-Isolate, nicht möglich ist.

So konnten ENDTZ et al. (2000) und HINDIYEH et al. (2000) eine Nachweisgrenze von 3×10^6 KbE/g bzw. ml für den ProSpecT[®] Microplate Assay ermitteln. Dies ist vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen von $1,2 \times 10^5$ KbE/ml, die das ELFA-System noch nachzuweisen vermochte. So konnten in fünf Proben *Campylobacter*-Keimzahlen von 1,2 bis $2,9 \times 10^5$ KbE/ml positiv erfasst werden. Alle Proben mit größeren Keimkonzentrationen als $1,2 \times 10^5$ KbE/ml wurden, bis auf eine Probe (s. u.), positiv detektiert.

Auffällig war eine dotierte Probe, in der zwar eine ermittelte Keimkonzentration von $4,0 \times 10^5$ KbE/ml vorlag, durch das ELFA-System jedoch nur ein Testwert knapp unterhalb der firmenseitig festgelegten cut-off-Schwelle ($TW = 0,09 < 0,1$) photometrisch bestimmt wurde. Eine Erklärung hierfür liegt höchstwahrscheinlich nicht in der Messeinheit des miniVIDAS, sondern in der Genauigkeit der kulturellen Ermittlung der Keimkonzentration begründet (→ Wiederholstandardabweichung s_r).

Das System detektierte sicher *Campylobacter* spp. in einem Konzentrationsbereich von $4,6 \times 10^5$ bis $6,7 \times 10^8$ KbE/ml (60 positive Proben, keine negativen Proben).

5.3.3.2 GLISA-System

Wie im ELFA wurden auch hier vergleichbare Ergebnisse erzielt, wobei die Keimkonzentration etwas höher lag, bei der das System noch ein positives Ergebnis in einer Probe erbrachte ($6,3 \times 10^5$ KbE/ml). Auch fällt auf, dass in drei Proben mit einer Keimzahl größer $6,3 \times 10^5$ KbE/ml das Ergebnis negativ ausfällt. Begründen lässt sich dies unter anderem durch die recht subjektive Farbwahrnehmung der Testbanden. So war selbst eine Probe mit ermittelter Keimkonzentration von $1,8 \times 10^6$ KbE/ml negativ zu bewerten, da die Bande nicht die Farbintensität einer Positivbande entsprach.

Das System detektierte *Campylobacter* spp. sicher in einem Konzentrationsbereich von $3,0 \times 10^6$ bis $6,7 \times 10^8$ KbE/ml (50 positive Proben, keine negativen Proben).

Beim Vergleich der immunologischen Systeme erweist sich das ELFA-System dem GLISA bezüglich der gerätespezifischen Nachweisgrenze als überlegen. So werden Proben mit einer 10-fach niedrigeren Keimkonzentration vom ELFA-System sicher positiv detektiert.

Beide immunologischen Protokolle lassen sich einfach durchführen. Das GLISA benötigt dafür keine technische Messeinheit.

5.3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Das molekularbiologische Verfahren detektierte Dotierungsproben schon mit deutlich niedrigeren *Campylobacter*-Konzentrationen positiv, als dies die immunologischen Testsysteme im Stande waren. So liegt die untere Nachweisgrenze schon bei $8,8 \times 10^3$ KbE/ml.

Die PCR erfasste Proben sicher, die eine *Campylobacter*-Keimkonzentration von $3,4 \times 10^4$ bis $6,7 \times 10^8$ aufwiesen (50 *Campylobacter*-positive Proben, keine negativ getestete Probe).

Auch DE BOER und BEUMER (1999) gaben eine Nachweisgrenze ihres genotypischen Tests mit 10^3 KbE/ml bzw. g an. Ein Vergleich beider Systeme ist jedoch schwierig, da die Methoden und Versuchsbedingungen voneinander differieren.

Im Allgemeinen sind molekularbiologische Methoden jedoch sensitiver als immunologische und Nachweisgrenzen werden zumeist zwischen 10^2 bis 10^3 ermittelt (MISAWA et al. 2002; CHENG und GRIFFITHS, 2003; LAGIER et al., 2004). OYOFO et al. (1992) ermittelten für ihr System eine notwendige Konzentration von 500-1000 KbE/g bzw. 30-60 Organismen/5µl.

In den vorliegenden Versuchen war die einfach durchzuführende DNA-Extraktion über das Kit-System möglich. Dabei sind gewisse DNA-Verluste nicht zu vermeiden. Dies erklärt vermutlich das negative Testergebnis in fünf Dotierungsproben mit Keimkonzentrationen über $8,8 \times 10^3$ KbE/ml.

Wie auch schon OPFER et al. (2001) beschrieben haben, spielt der Extraktionsvorgang eine wesentliche Rolle, wobei DNA-Verluste möglichst vermieden werden sollten, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Andere Erklärungen für die negativen Ergebnisse sind zwar auch denkbar (z. B. inhibitorische DNA-Extrakte), ein Fehler innerhalb der eigentlichen PCR-Reaktion und anschließender Gelelektrophorese scheint jedoch unwahrscheinlich, da neben den auffallenden fünf Proben die Positiv-, Negativkontrollen und andere Dotierungsproben des gleichen PCR-Durchganges richtig detektiert wurden.

Der Nachweis von Amplifikaten sollte verifiziert werden.

So traten wenige Banden auf, die nahe den spezifischen Banden (hier: 450 nm) lagen. Auch ein hin und wieder auftretender „smile-Effekt“ in der Gelelektrophorese erschwerte die Interpretation.

Die Verifikation kann über Sequenzierung oder aber wie in der Methode nach OYOFO et al. (1992) beschrieben über Sonden realisiert werden. Auch OPFER et al. (2001) machten deutlich, dass es beim Screening von Geflügelfleisch mit dem pg50/pg3-System nach OYOFO et al. zwingend erforderlich ist, durch abschließende Hybridisierung (Southernblot-Technik) erhaltenen Amplikate die Sensitivität und die Spezifität zu erhöhen. Durch das parallele Mitführen von externen Amplifikationskontrollen können falsch-negative Ergebnisse zuverlässig vermieden werden.

Auch ein weiteres Primersystem kann die Ergebnisse absichern, wobei sich in dieser Studie die Methode von BEST et al. (2003) als vorteilhaft erwies, da das Primersystem (mapA/ceuE) ebenfalls nur die beiden Spezies *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* nachzuweisen vermag. Die in der PCR nach OYOFO et al. als zweifelhaft bewerteten Banden stellten sich ebenso in der Rapid Duplex-Realtime PCR nach BEST et al. (2003) als unspezifische Banden heraus.

Das verwendete Primersystem nach OYOFO et al. erweist sich als ein sehr sensitives Nachweissystem, das gut geeignet wäre eine große Anzahl von Proben auf *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* zu untersuchen (Screening).

Die technischen Voraussetzungen und die Notwendigkeit ausreichend geschulten Personals zur Durchführung dieser Methode, beschränkt den Nachweis allerdings auf spezialisierte Laboreinheiten (siehe auch 5.4 Eignung der Verfahren in der Praxis).

5.3.4 Methodenabhängige Nachweisgrenze

Unter Verwendung eines mit *Campylobacter jejuni* dotierten Fleischbräts konnte bei Betrachtung der drei unterschiedlichen Dotierungslevel (niedrig, mittel, hoch) kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl positiver Testergebnisse in den verschiedenen Methoden (GLISA, ELFA, PCR) festgestellt werden. Ausschließlich im niedrigsten Level (0,4-8,5 KbE/g) wurden dotierte Proben (n = 48) unterschiedlich häufig von den jeweiligen Systemen als *Campylobacter*-positiv erkannt. Die GLISA-Methode erkannte hierbei nur 54 % der Proben positiv (26/48). Mit 30 positiv erfassten Proben über das molekularbiologische Protokoll erkannte die PCR nur eine Probe weniger als das Referenzverfahren. Signifikant sind diese Unterschiede nicht.

Alle drei Systeme erweisen sich als sensible Nachweissysteme, die im Vergleich zum Referenzverfahren vergleichbare Ergebnisse lieferten.

Auch BUBERT et al. (2004) stellten bei vergleichenden Studien eine hohe Übereinstimmung der ISO-Methode mit dem des miniVIDAS® Systems fest. Die durch sie ermittelte methodische Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei vergleichbaren 1 bis 11 KbE/25 g Lebensmittel.

Alle hochdotierten Proben wurden von den Nachweismethoden (Referenzmethode, alternative Nachweismethoden) positiv detektiert.

Im mittleren Level (30-60 MPN/g) wurden von allen Systemen noch 92 % der Proben positiv getestet.

Niedrigste Dotierungskonzentrationen von 0,4-8,5 KbE/g werden ebenso von den Systemen detektiert. Das ELFA erfasste von 48 Proben dieses Levels 58 %, das GLISA 54 % und die PCR 62 % als *Campylobacter*-positiv.

Da die Herstellung der dotierten Proben dem Herstellungsverfahren im Fleischerhandwerk entsprechen sollte, wurde die Dotierungslösung in totu der Gesamtbrätcharge zugesetzt und im Kutter homogenisiert. Kutterhilfsstoffe und Gewürze wurden nicht eingesetzt. Damit wurde eine natürliche Kontamination der Brätcharge simuliert. Die hier angewendete Dotierungstechnik erwies sich als vorteilhaft und eignet sich gut zur Erzeugung von in gleicher Weise behandelten Proben. Um längere und unterschiedliche Standzeiten bis zur Einbringung in die Anreicherungsbouillon zu vermeiden, wurden nicht mehr als 12 Proben pro Charge entnommen.

Mehr als 20 Proben pro Charge führte zwangsläufig zu längeren Standzeiten im Arbeitsablauf und zu einer erniedrigten Nachweisrate (ZIRKELBACH, 2003).

Mit dem Kutter können *Campylobacter jejuni* in geringer Konzentration in ein Modellbrät eingemischt werden. Dies wird durch die Untersuchungsergebnisse der Diplomarbeit von ZIRKELBACH (2003) bestätigt, in der genauer auf die hier angewandte Homogenisierungstechnik und weitere Parameter, die die Homogenisierung beeinflussen können, eingegangen wurde. Einmischkonzentrationen unterhalb von $4,0 \times 10^0$ KbE/g führten zu unregelmäßigen Ergebnissen im kulturellen *Campylobacter*-Nachweis zwischen Proben gleicher Chargen. Eine homogene Verteilung der *Campylobacter jejuni* ist unterhalb dieser Einmischkonzentration nicht zu erwarten. Dies zeigten auch die Ergebnisse dieser Studie in den Versuchen mit niedrigem Keimkonzentrationslevel.

Es war zu erwarten gewesen, dass insbesondere kleine Dotierungskonzentrationen keine vollständige Homogenisierung in der Brätcharge durch das Kuttern erfahren oder *Campylobacter*-Keime während der Homogenisierung absterben würden.

So traten Modellbrätproben auf, die mit weniger als $4,5 \times 10^0$ KbE/g (Versuch V) eingemischter Bakterienkonzentration von allen Systemen als *Campylobacter*-negativ erfasst wurden. Eine Probe dieses Dotierungsversuchs wurde hingegen von allen Systemen positiv detektiert.

Der VBNC-Status spielte in den negativ detektierten Proben höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle. So konnten nur geringste *Campylobacter*-Keimkonzentrationen in diesen Proben nach Anreicherung nachgewiesen werden, die unterhalb der methodischen Nachweisgrenze der Systeme lagen (siehe auch Anhang E).

Interessanterweise reicherten sich die *Campylobacter jejuni* in den Proben des VI. Dotierungsversuchs, mit einer dem V. Versuch vergleichbaren Dotierungskonzentration von $4,0 \times 10^0$ KbE/g, deutlich besser an. Alle sechs Proben dieses Versuches erreichten Keimkonzentrationen oberhalb der methodischen Nachweisgrenzen der Testverfahren und wurden als *Campylobacter*-positiv erkannt (siehe Anhang E). Die Begleitkeimflora in den Versuchen V und VI war vergleichbar hoch (siehe Anhang D).

Im VIII. Dotierungsversuch wurden drei Proben kulturell als präsumtiv positiv befundet, da die Begleitkeimflora entscheidend in den Vordergrund trat und die *Campylobacter*-Kolonien überwucherte. Eine biochemische Bestätigung konnte nicht durchgeführt werden. Da nur das mikroskopische Ergebnis (Motilität, Morphologie) vorlag, konnten diese Kolonien als nicht eindeutig positiv bewertet werden (siehe Anlage F).

5.3.5 Verwendung einer 24 h und 48 h Anreicherungsbouillon

Vergleicht man die unterschiedlichen Systeme unter Verwendung einer 24 h Anreicherungsbouillon, so fällt auf, dass das Referenzverfahren den immunologischen und molekularbiologischen Verfahren signifikant im Nachweis von *Campylobacter* spp. überlegen ist. Hierfür sind insbesondere die methodischen Nachweisgrenzen der alternativen Verfahren verantwortlich, die den Nachweis erst ab einer höheren *Campylobacter*-Keimkonzentration ermöglichen.

Längere Anreicherungszeiten über 48 h erbrachten signifikant mehr positive Probenergebnisse in den jeweiligen Nachweissystemen. Im Vergleich untereinander detektierte jedoch keines der alternativen Testsysteme signifikant mehr positive Proben aus der 48 h Bouillon. Diese Testsysteme unterschieden sich somit im *Campylobacter*-Nachweis hier nicht voneinander.

Auch BANDICK et al. (2005) stellten nach Verlängerung der Anreicherungszeiten der Preston-Bouillon einen deutlichen Anstieg der Nachweisrate in der PCR fest (Protokoll nach WANG et al., 2002). Längere Anreicherungszeiten über 48 h und 72 h erbrachten mehr positive Ergebnisse als eine bereits nach 24 h beendete Anreicherung. Nach 72 h fiel die Nachweisrate gegenüber der nach 48 h ermittelten wieder ab.

Folglich wäre eine Verkürzung der in dieser Studie angewandten Verfahrensprotokolle der PCR und den beiden immunologischen Systemen, insbesondere des GLISAs, welches eine hohe Nachweisgrenze des Verfahrens besitzt, äußerst ineffektiv und würde zu vermehrt falschnegativen Resultaten führen. Die seitens des Herstellers angegebene Anreicherungszeiten sollten möglichst nicht verkürzt werden und sind innerhalb der Toleranzzeiten zu führen (z. B. ELFA +/- 2 Stunden). Jede Verkürzung der Anreicherungszeit kann zu Keimkonzentrationen in der Bouillon führen, die gerade noch unterhalb der individuellen Nachweisgrenze des Systems liegen. Dies kann bei gering kontaminierten Lebensmitteln ausschlaggebend für den *Campylobacter*-Nachweis sein.

Bezüglich der Referenzmethode ist eine Verlängerung der Anreicherungszeit von 24 h auf 48 h sinnvoll und empfehlenswert, um eine höhere Nachweisrate zu erhalten (s. o.). Auch die aktuelle Version der ISO 10272 hat diesen Punkt aufgegriffen und gibt eine Anreicherungszeit zwischen 24 h und 48 h an. Die Version ISO 10272:1995 beschrieb noch eine Anreicherungszeit von „nur“ 18 Stunden.

5.4 Eignung der Verfahren in der Routinediagnostik und Ausblick

Die Eignung einer Methode für den Routineeinsatz ist neben den oben diskutierten Validierungsparametern auch von anderen Faktoren abhängig. So spielen das zukünftige Einsatzgebiet eine entscheidende Rolle. Screeningmethoden sollten große Proben-durchsätze gewährleisten und gleichzeitig schnelle, sichere Ergebnisse liefern.

5.4.1 ELFA-System

Der Vorteil der ELFA-Methode liegt in ihrer Automatisierung. Die Manipulationsmöglichkeit durch den Menschen wird minimiert, so auch evtl. Pipettierfehler. Das Gerät erwies sich als sehr wartungsarm.

Testergebnisse sind zeitnah (ca. 70 min. ohne Anreicherungsschritt) ermittelbar und werden als Ausdruck dokumentiert (QM). Ein hoher Probendurchsatz im Sinne eines Screenings ist möglich und der routinemäßige Einsatz unproblematisch durchführbar. Im Vergleich zur PCR ist die Durchführung des Protokolls in Kürze erlernbar und besitzt weniger manuelle Schritte. Die Auswertung ist herstellerseitig automatisiert. Einzig die geforderte kulturelle Bestätigung positiver Resultate benötigt wieder geschultes mikrobiologisches Fachpersonal.

Insgesamt werden labor- und zeitintensive Prozeduren, wie im Referenzverfahren vorhanden, durch die ELFA-Methode reduziert. Negative bzw. präsumtiv positive Ergebnisse liegen schon am 2. Tag nach dem Anlegen vor. Dies sind wichtige Kriterien in Zeiten knapper Personalressourcen der staatliche Kontrollinstitutionen sowie Lebensmittel- und Schlachtbetrieben, in denen diese Methode im Qualitätssicherungssystem (HACCP) anzusiedeln denkbar wäre.

Ein Einsatzgebiet als Screeningmethode von Schlachtgeflügel vorab einer kulturellen Isolierung ist möglich.

Die Verbrauchskosten pro Testriegel liegen bei ca. 8 Euro. Die Gerätekosten liegen im unteren 5-stelligen Bereich.

Der Nachweis gängiger weiterer lebensmittelrelevanter Keime (*Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp.) über andere Riegel ist auch möglich. Ein Einsatzgebiet über den Nachweis von Bakterien hinaus ist zudem durchführbar (klinische Parameter etc.).

5.4.2 GLISA-System

Auch der GLISA führt zu einer deutlichen Reduktion des Arbeits- und Zeitaufwandes im Vergleich zum Referenzverfahren. Unter ökonomischen Gesichtspunkten betrachtet, besitzt der im Vergleich zum ELFA etwas weniger sensitive GLISA einen entscheidenden Vorteil. So

ist der Zeitvorteil des GLISA- gegenüber des ELFA-Protokolls zwar nur marginal (Ergebnisse nach ca. 20 min. ohne Anreicherungsschritt). Ein kostenintensives Analysegerät ist hier jedoch nicht notwendig.

Preislich gestaltet sich der GLISA mit 8 € pro Test als günstiges System.

Der Test ist einfach zu handhaben, schnell in der Durchführung und leicht auszuwerten und kann für die Routinediagnostik (Screening) empfohlen werden.

Nachteil des Systems stellte die sehr subjektive Auswertung dar, wobei aufgrund zu schwacher Bandenfärbung in wenigen Fällen nur ein negatives Testergebnis ermittelt werden konnte (siehe 5.3.3). Dies liegt vor allem an der Empfindlichkeit des Testsystems. Der Hersteller empfiehlt eine ausreichende Anreicherung über 48 h und parallele kulturelle Bestätigung. Bei Unklarheiten wird der Einsatz zusätzlicher Gensonden empfohlen.

Auch BUBERT et al. (2004a) stellten bei hohen *Campylobacter*-Keimkonzentrationen im Bereich von $1,6 \times 10^6$ KbE/ml z. T. schwache GLISA-Reaktionen (Banden) fest, die auf einer Farbintensitäts-Skala (1-10) nur zwischen Werten von 2 bis 5 einzuordnen waren. Keimkonzentrationen von $1,6 \times 10^5$ KbE/ml ergaben kein Signal mehr, wobei der ELFA hier noch eindeutig positive Signale liefern konnte.

5.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die hier angewendete PCR-Methode kann im Routinelabor für das schnelle und sensitive Screening von Lebensmittel- und Geflügelkotproben eingesetzt werden. Zeitnahe, zuverlässige Nachweise sind schon nach ca. 5 h möglich (exklusiv 24 h Anreicherungsschritt und einer evtl. Verifikation). Die Durchführung ist von intensiv geschultem Fachpersonal im mikrobiologisch ausgestatteten Labor durchzuführen (Mehrraumaufteilung, Abzug/Lamina-Flow etc.).

Zudem ist der apparative Aufwand zu berücksichtigen, wobei der Thermocycler, die Gelelektrophorese und das Dokumentationssystem eines der größten Kostenfaktoren darstellen.

Neben den gängigen Verbrauchsmaterialien für die PCR stellen die Komponenten zur Herstellung des Mastermixes (z. B. Primer) einen gewichtigen Kostenfaktor dar. Die begrenzten Haltbarkeiten sind hierbei ebenso zu beachten.

Eine automatisierte Prozessführung ist nur in Teilen, und dann auch nur unter apparativem Aufwand, für die klassische PCR realisierbar. Dies ist erst bei hohem Probendurchsatz rentabel.

Kommerzielle Testkitsysteme (z. B. Mastermix) sind für das hier verwendete Primersystem dem Autor nicht wesentlich bekannt.

Die PCR-Ergebnisse können einfach über digitale Fotografie dokumentiert und archiviert werden (QM).

Zukünftig ist die Übertragung der Methode auf das System einer Realtime-PCR denkbar und würde einen noch höheren Probendurchsatz in kürzerer Zeit versprechen. Die arbeitsintensive Gelelektrophorese und das z. T. risikobehaftete Ethidiumbromid-Färbebad der Gelelektrophorese würden sich dann erübrigen.

5.4.4 Abschlussbemerkung:

Validierungsmaßnahmen und Implementierungen von neuen Schnellmethoden in den unterschiedlichen Lebensmittelunternehmen und Kontrollinstanzen (Untersuchungsämter) werden weiterhin notwendig sein, um den hohen Verbraucherschutz im Sinne des europäischen Leitgedankens „from farm to fork“ bzw. „from stable to table“ zu gewährleisten. Dies ist die Absicht aller am Lebensmittelverkehr beteiligten privaten sowie staatlichen Interessensgruppen.

Die Reduktion *Campylobacter*-positiver Tierbestände und Lebensmittelprodukte ist wünschenswert und kann nur aus konsequenter Überwachung dieses Pathogens erfolgen (Monitoring). Aktionspläne in Zusammenarbeit mit der Wissenschaft, den Regierungsbehörden und der Industrie sind erfolgversprechend (HOFSHAGEN und KRUSE, 2005).