

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Prävalenz von *Arcobacter spp.* in Puten- und Schweinefleisch  
aus dem Berliner Einzelhandel  
und  
Vergleich von drei kulturellen *Arcobacter*-Nachweisverfahren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Miriam Teschke  
Tierärztin  
aus Potsdam-Babelsberg

Berlin 2008  
Journal-Nr.: 3214

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Peggy Braun  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

*Arcobacter, turkey meat, pork, isolation, identification, PCR*

Tag der Promotion: 12.06.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-421-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008  
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866  
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

**TU, WAS DU KANNST,  
MIT DEM, WAS DU HAST,  
DORT, WO DU BIST.**

THEODORE ROOSEVELT



## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Geschichtlicher Überblick und taxonomische Einordnung.....	3
2.1.1	Geschichtlicher Überblick.....	3
2.1.2	Taxonomische Einordnung.....	4
2.2	Charakteristika von <i>Arcobacter spp.</i> .....	5
2.2.1	<i>Arcobacter spp.</i> .....	5
2.2.2	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> .....	5
2.2.3	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> .....	6
2.2.4	<i>Arcobacter butzleri</i> .....	7
2.2.5	<i>Arcobacter skirrowii</i> .....	8
2.2.6	<i>Arcobacter cibarius</i> .....	8
2.2.7	<i>Arcobacter halophilus</i> .....	9
2.2.8	Übersicht der Charakteristika von <i>Arcobacter spp.</i> .....	9
2.3	Virulenzfaktoren und Pathogenese.....	11
2.4	Nachweisverfahren.....	15
2.4.1	Kulturelle Verfahren zum Nachweis von <i>Arcobacter spp.</i> .....	15
2.4.2	Genotypische Differenzierungsmethoden für <i>Arcobacter spp.</i> .....	19
2.5	Epidemiologie und Vorkommen von <i>Arcobacter spp.</i> .....	23
2.5.1	Epidemiologie und Vorkommen beim Menschen.....	23
2.5.2	Epidemiologie und Vorkommen beim Tier.....	25
2.5.2.1	Nachweis aus klinischem Material.....	25
2.5.2.2	Nachweis bei klinisch gesunden Tieren.....	27
2.5.3	Vorkommen in der Umgebung.....	29
2.5.4	Vorkommen in Fleisch und Fleischerzeugnissen.....	30
2.5.5	Vorkommen in Wasser.....	32
2.5.6	Vorkommen in anderen Lebensmitteln.....	33
2.5.7	Kritische Überlegungen bei der Evaluierung derzeitiger Nachweisdaten.....	33
2.6	Tenazität von <i>Arcobacter spp.</i> .....	37
2.6.1	Temperaturtoleranz.....	37
2.6.2	Hitzebeständigkeit.....	38
2.6.3	pH-Wert.....	39
2.6.4	Wasseraktivität.....	39
2.6.5	Desinfektionsmittel und organische Säuren.....	41
2.6.6	Bestrahlung.....	42
2.6.7	Verhalten gegenüber Metallen.....	43
2.6.8	Verhalten gegenüber Antibiotika.....	43
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>47</b>
3.1	Qualitative Untersuchung von Puten- und Schweinefleischproben auf <i>Arcobacter spp.</i> nach HOUF et al. (2000, 2001b).....	47
3.1.1	Untersuchungsmaterial und Probennahme.....	47
3.1.2	Nährmedien, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	49
3.1.3	Probenaufbereitung und Kultivierung.....	51
3.1.4	Isolierung, Differenzierung und Auswertung.....	52
3.1.5	Schematische Darstellung der Nachweisverfahren.....	59
3.1.6	<i>Arcobacter</i> -Kontrollstämme.....	59

3.2	Vergleich kultureller Nachweisverfahren:.....	61
	HOUF et al. (2001b), JOHNSON und MURANO (1999a, b) und JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004).....	61
3.2.1	Untersuchungsmaterial und Probennahme.....	61
3.2.2	Nährmedien, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterial.....	61
3.2.3	Probenaufbereitung und Kultivierung von <i>Arcobacter spp.</i> .....	64
3.2.4	Isolierung, Differenzierung und Auswertung.....	67
3.2.5	Schematische Darstellung der Nachweisverfahren.....	68
3.2.6	<i>Arcobacter</i> -Kontrollstämme.....	69
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>70</b>
4.1	Qualitative Untersuchung von Puten- und Schweinefleischproben auf <i>Arcobacter spp.</i> nach HOUF et al. (2001b).....	70
4.1.1	Putenfleisch.....	70
4.1.2	Schweinefleisch.....	74
4.1.3	Vergleich der Befunde in Puten- und Schweinefleisch sowie Verteilung der Spezies.....	77
4.2	Vergleich kultureller Nachweisverfahren.....	79
4.2.1	HOUF et al. (2001b).....	79
4.2.2	JOHNSON und MURANO (1999a, b).....	80
4.2.3	JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004).....	82
4.2.4	Methodischer Vergleich und Eignung.....	86
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arcobacter</i>
AFLP	Amplified fragment length polymorphism, Amplifizierter-Fragment-Längen-Polymorphismus
BHI	Brain heart infusion
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Campylobacter</i>
ca.	circa
CAT	Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin
CCDA	Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar
CFU	Colony forming unit, Kolonie-bildende Einheit (KbE)
CIN	Cefsulodin Irgasan Novobiocin
CVA	Cephalothin Vancomycin Amphotericin B
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomal desoxyribonucleic acid, ribosomale Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, enzymgebundener Adsorptionstest
EMJH-P-80	Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris Polysorbat 80
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
et al.	lateinisch: et alii = und andere
g	Gramm
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogray
l	Liter
mCCDA	modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar
mg	Mikrogramm
MIC	Minimum inhibitory concentration, Minimale Hemmkonzentration (MHK)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
n	Probenzahl
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, Polyacrylamidgelelektrophorese

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulse-field gel electrophoresis, Pulsfeldgelelektrophorese
pH	Pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RAPD	Random amplified polymorphic DNA, zufällig amplifizierte polymorphe DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism, Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
sec	Sekunde(n)
sp./spp.	Spezies, Art (Singular/Plural)
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid
U	Units
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
v/v	volume/volume (Vol.-%)
w/v	weight per volume (Gewichts-%)
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Σ	Summe

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Taxonomie von <i>Arcobacter spp.</i> (angelehnt an GARRITY et al., 2005).....	4
Abbildung 3.1: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate.....	58
Abbildung 3.2: Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b).....	59
Abbildung 3.3: Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b).....	68
Abbildung 3.4: Ablaufschema JOHNSON-MURANO (1999a, b) und JOHNSON-MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004).....	69
Abbildung 4.1: Nachweishäufigkeit von <i>Arcobacter spp.</i> in Putenfleisch (n = 151).....	71
Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung der <i>Arcobacter</i> -positiven Proben auf die Putenfleischerzeugnisse.....	71
Abbildung 4.3: Nachweishäufigkeit von <i>Arcobacter spp.</i> in Schweinefleisch (n = 93).....	75
Abbildung 4.4: Prozentuale Verteilung der <i>Arcobacter</i> -positiven Proben auf die Schweinefleischerzeugnisse.....	75
Abbildung 4.5: Verteilung positiver Proben nach JOHNSON-MURANO modifiziert.....	87
Abbildung 4.6: Verteilung positiver Proben nach HOUF et al. und JOHNSON-MURANO.....	87
Abbildung 4.7: Verteilung positiver Proben nach HOUF et al. und JOHNSON-MURANO modifiziert.....	87

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2.1.: Charakteristika von <i>Arcobacter spp.</i> .....	9
Tabelle 2.2.: In-vitro-Pathogenitätsstudien über <i>Arcobacter spp.</i> .....	12
Tabelle 2.3.: Vorkommen von <i>Arcobacter</i> in Rohfleisch aus dem Einzelhandel.....	30
Tabelle 2.4.: <i>Arcobacter</i> -Verteilung nach Direktisolation und nach Anreicherung .....	34
Tabelle 2.5.: Sensibilität von <i>Arcobacter spp.</i> gegenüber NaCl und $a_w$ -Werten.....	41
Tabelle 2.6.: Resistenzverhalten von <i>Arcobacter spp.</i> .....	45
Tabelle 3.1.: Probenart und Anzahl der Puten- und Schweinefleischerzeugnisse (n = 244)..	48
Tabelle 3.2.: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Amplifizierung.....	56
Tabelle 3.3.: Basensequenz der Primer nach HOUF et al. (2000).....	56
Tabelle 3.4.: Übersicht der verwendeten Isolierungsmethoden .....	66
Tabelle 4.1.: Vorkommen von <i>Arcobacter spp.</i> in den untersuchten Putenfleischproben (n = 151).....	72
Tabelle 4.2.: Vorkommen von <i>Arcobacter spp.</i> in Schweinefleisch (n = 93).....	76
Tabelle 4.3.: Überblick Vorkommen von <i>Arcobacter spp.</i> in Puten- und Schweinefleisch.....	78
Tabelle 4.4.: Isolierungsraten: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - Methode HOUF et al. (n = 51).....	80
Tabelle 4.5.: Übereinstimmende Ergebnisse: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - JOHNSON-MURANO-Methode (n = 51).....	81
Tabelle 4.6.: Diskrepante Proben: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - JOHNSON-MURANO-Methode.....	82
Tabelle 4.7.: Untersuchungsergebnisse der drei Nachweisverfahren.....	84
Tabelle 4.8.: Nachweishäufigkeit von <i>Arcobacter spp.</i> in Putenfleisch im Vergleich HOUF et al., JOHNSON-MURANO, JOHNSON-MURANO modifiziert.....	86

## 1 Einleitung

1991 wurde ein neues Taxon ausgewiesen: *Arcobacter*. Die Vertreter dieser Gattung wurden von der ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) der Gruppe der "emerging foodborne pathogens", das heißt Keime, von denen in neuerer Zeit bekannt wurde, dass sie Lebensmittelintoxikationen bzw. -infektionen hervorrufen und somit eine erhebliche Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen, zugeteilt. *Arcobacter spp.* können als Auslöser einer menschlichen Gastroenteritis eine Rolle spielen, werden mit Septikämien assoziiert und wurden gelegentlich auch außerhalb des Magen-Darm-Traktes bei extraintestinalen Krankheiten gefunden. Bei *Arcobacter spp.* handelt es sich um gramnegative, gebogene oder spiralförmige Stäbchen, die sich mit Hilfe polarer Begeißelung selbständig fortbewegen können. Zusammen mit *Campylobacter spp.* und *Sulfurospirillum spp.* gehören sie der Familie *Campylobacteriaceae* an. Phylogenetisch eng mit der Gattung *Campylobacter* verwandt und ihr in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich, zeigen *Arcobacter* im Gegensatz zu ersterem eine große Sauerstofftoleranz und wachsen auch bei niedrigen Temperaturen (15 °C bis 25 °C).

Krankheitsausbrüche, die in Verbindung mit dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel einschließlich Wasser sowie mit dem Kontakt zu infizierten Tieren gebracht werden, sind dokumentiert. Rohes und nicht ausreichend gegartes Fleisch birgt ein beträchtliches Gefahrenpotential für eine alimentäre Übertragung. Als Hauptquelle für humane *Arcobacter*-Infektionen wurde bisher Hühnerfleisch angesehen. Die Keime fanden sich aber auch im Darm von gesunden Rindern, Schweinen, Schafen und Pferden, sodass den landwirtschaftlichen Nutztieren insgesamt eine Bedeutung als Ausscheider zugemessen wird. Über den Mechanismus der Pathogenität, der Tenazität und der Ökologie von *Arcobacter* ist derzeit noch relativ wenig bekannt.

Obschon in den letzten Jahren für den Nachweis von *Arcobacter* verschiedene kulturelle Nachweissysteme entwickelt wurden, bestehend aus Selektivanreicherung und Kultivieren auf festen Selektivnährmedien, gibt es zur Zeit noch kein eingeführtes Referenzverfahren gemäß der amtlichen Methode nach § 64 Lebensmittel-Futtermittel-Gesetzbuch (LFGB), vormals § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG), oder der International Organization for Standardization (ISO).

Das Fehlen normierter Isolationsprotokolle schränkt zum einen die Möglichkeit ein, die vorhandenen Felddaten zu vergleichen. Zum anderen sinkt auch die Motivation, ausreichend Daten über die Verbreitung von *Arcobacter* zu sammeln. Deshalb lässt sich die Bedeutung von *Arcobacter* als Erreger, der über Nahrungsmittel übertragen wird, bislang nicht zuverlässig beurteilen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Puten- und Schweinefleisch auf das Vorkommen von *Arcobacter spp.* zu untersuchen. Hierfür kam sowohl das von HOUF et al. (2001b) empfohlene kulturelle Nachweisverfahren als auch die von ihnen entwickelte speziesspezifische multiplex PCR-Analyse HOUF et al. (2000) zum Einsatz. In einer weiteren Untersuchung wurden drei kulturelle Isolierungsverfahren, das Verfahren nach HOUF et al. (2001b), nach JOHNSON und MURANO (1999a, b) sowie die modifizierte JOHNSON und MURANO-Methode nach SCULLION et al. (2004), geprüft sowie hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit, Eignung und Handhabung verglichen und beurteilt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichtlicher Überblick und taxonomische Einordnung

#### 2.1.1 Geschichtlicher Überblick

Im Jahr 1977 und 1978 beschrieben ELLIS et al. kleine, gekrümmte, gramnegative, stäbchenförmige Keime, die sie aus abortierten Rinder- und Schweinföten isoliert hatten. Der Nachweis gelang ihnen mit einem halbfesten Selektivmedium für Leptospiren (EMJH-P-80-Medium: Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris Polysorbat 80). Anfangs als *Vibrio*-Spezies ähnlich beschriebene Erreger, wurde erst bei späteren Untersuchungen unter Berücksichtigung der kulturellen und morphologischen Eigenschaften, der Zusammensetzung der DNA und deren Guanin- und Cytosin-Gehaltes (G und C, 29 - 43 mol- %), des fehlenden fermentativen Metabolismus sowie ihrer schnellen, schießenden Bewegung mittels eines einzelnen, polaren Flagellum (ELLIS et al., 1977) die Verwandtschaftsbeziehung zu den Vibrionen aufgelöst. Nunmehr wurde angenommen, dass es sich um eine neue *Campylobacter*-Spezies handelt.

1983 und 1985 fanden McCLUNG et al. und NEILL et al. zwei neue Spezies: *Campylobacter nitrofigilis* und *Campylobacter cryaerophila*. Sie wurden offiziell den Mitgliedern der rRNA-Superfamilie VI der Klasse *Proteobacteria*, Familie *Campylobacteraceae*, zugeordnet. Trotz der vielen Eigenschaften, die eine enge Verwandtschaft zur Gattung *Campylobacter* begründeten, zeigten neue Isolate andere physiologische Merkmale, die nicht für *Campylobacter* charakteristisch waren. Die Tatsache, dass diese Bakterien im Gegensatz zu allen *Campylobacter spp.* die Fähigkeit besitzen, bei niedrigeren Temperaturen und unter Anwesenheit von Sauerstoff schnell zu wachsen, weckte Zweifel an der Zuordnung. Das fehlende Wachstum auf *Campylobacter*-Selektivmedien sowie das Ausbleiben einer Agglutination mit Antiserum der hitzestabilen Antigene A, B und C von *C. fetus* erhärteten die bestehenden Zweifel. Neue Isolierungsmedien und -techniken wurden entwickelt, um mehr Informationen über diese Keime zu erhalten und eine Differenzierung zu ermöglichen.

PCR-RFLP-Analysen erbrachten eine 68 %ige Homologie zwischen den neuen Bakterien und *Campylobacter* sowie eine 87 %ige Homologie innerhalb der neuen Keime (THOMPSON et al., 1988). Zusätzlichen Überprüfungen der Verwandtschaftsgrade zwischen

*Campylobacter* und den anderen Genera der Superfamilie VI mittels DNA:rRNA Hybridisierung, Immunotypisierung und SDS-PAGE folgte eine weitere taxonomische Abgrenzung mit der Schaffung der Genera *Campylobacter* und *Arcobacter* (VANDAMME et al., 1991). Aufgrund molekularbiologischer Untersuchungen wurden *Arcobacter* aus dem Genus *Campylobacter* gelöst, wegen ihrer genotypischen und phänotypischen Eigenschaften aber ebenfalls dieser Familie zugeordnet.

### 2.1.2 Taxonomische Einordnung

*Arcobacter* zählt zur Familie *Campylobacteraceae*. Diese Familie wurde von VANDAMME und LEY (1991) vorgeschlagen. Sie ist gemeinsam mit den *Helicobacteraceae* der rRNA-Superfamilie VI zugehörig. Die Familie *Campylobacteraceae* untergliedert sich in die Gattung I *Campylobacter*, Gattung II *Arcobacter* und Gattung III *Sulfurospirillum*. (Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology, Volume 2 of the 2nd Edition, GARRITY et al., 2005)

Derzeitig gibt es sechs anerkannte Spezies von *Arcobacter*:

**A. nitrofigilis** (1983, früher: *Campylobacter nitrofigilis*), **A. cryaerophilus** (1985, mit zwei verschiedenen Untergruppen, früher: *Campylobacter cryaerophila*), **A. butzleri** (1991), **A. skirrowii** (1992), **A. cibarius** (2005) und **A. halophilus** (2005).

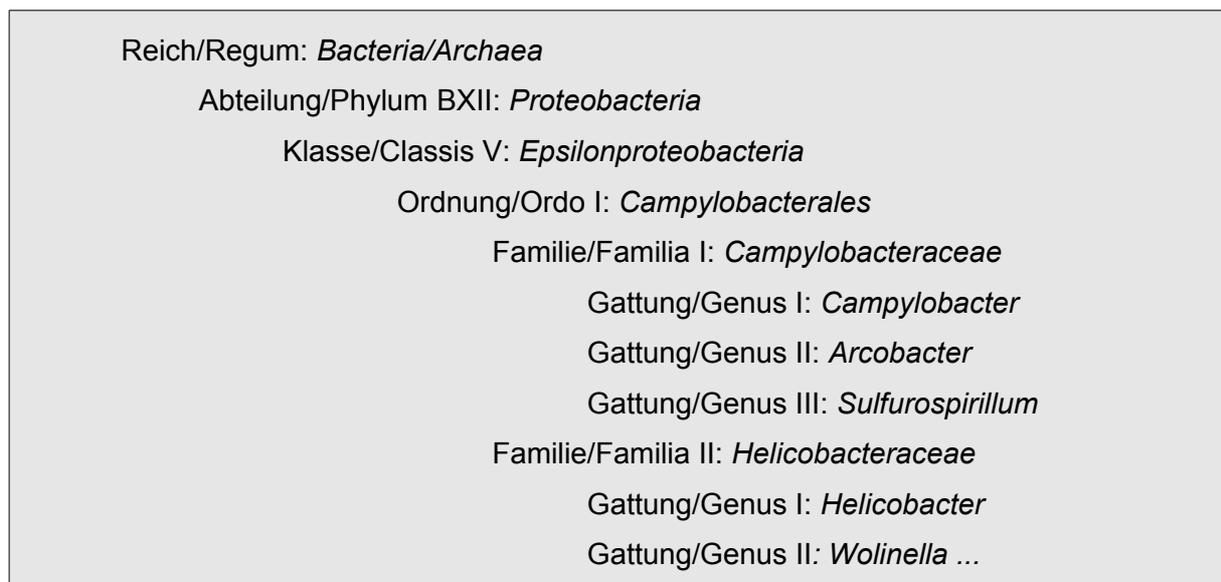


Abbildung 2.1: Taxonomie von *Arcobacter* spp. (angelehnt an GARRITY et al., 2005)

## 2.2 Charakteristika von *Arcobacter spp.*

### 2.2.1 *Arcobacter spp.*

Die Gattung *Arcobacter* (Lateinisch arcus = Bogen, Griechisch bacter = Stäbchen) umfasst gramnegative, sporenlose, gekrümmte, S-förmige oder spiralig gewundene Stäbchen mit einer Länge von 1 bis 3 µm und einer Breite 0,2 bis 0,9 µm. Eine polar monotriche, unbescheidete Flagelle verleiht diesen Bakterien eine "pfeilartige", korkenzieherähnliche Beweglichkeit. Wachstum erfolgt bei 15 °C, 25 °C und 30 °C. Optimal vermehren sie sich unter mikroaeroben Bedingungen (3 bis 10 % O<sub>2</sub>), wobei sie keinen Wasserstoff benötigen. Im Temperaturbereich zwischen 37 °C und 42 °C kann das Wachstum variieren.

*Arcobacter spp.* können in Medien wachsen, die 1 % (wt/vol) Pteridin (0/129) enthalten, wohingegen bei Anwesenheit von 0,1 % 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid (TTC, wt/vol) die Vermehrung gehemmt ist. In Nährsubstrat mit 0,04 % TTC, 1 % Glycin, 2 % Galle, 2 - 4 % NaCl oder 8 % Glukose ist variables Wachstum zu beobachten. In Dreizuckereisenagar bilden sie kein H<sub>2</sub>S, allerdings geben sie sich bei der H<sub>2</sub>S-Bildung aus Cystein variabel. Uneinheitlich zeigen sie sich auch bei der Reduktion von Nitrat und der DNA-Hydrolyse. Typisch für alle Vertreter dieser Gattung ist die Oxidation und Hydrolyse von Indoxylacetat sowie das Fehlen von alkalischer Phosphatase, Nitritreduktion, Methylrot- und VOGES-PROSKAUER-Reaktion, Indolbildung, Hippursäure-, Gelatine-, Aesculin- und Stärkehydrolyse. Die meisten Vertreter dieser Gattung sind nicht hämolytisch, lediglich *A. skirrowii* besitzt häufig die Fähigkeit zur Alpha-Hämolyse.

Kohlenhydrate werden von *Arcobacter spp.* weder fermentiert noch oxidiert, weshalb Energie aus der Verwertung von organischen Säuren und Aminosäuren bezogen werden muss. Hauptstoffwechselendprodukte der Atmung sind Menachinon-6 und ein zweites atypisches Menachinon-6. (VANDAMME et al., 1991, 1992a)

### 2.2.2 *Arcobacter nitrofigilis*

*nitrofigilis* (Lateinisch: nitrum = natürliches Mineralsalz, alkalischen Ursprungs; figilis = fixierfähig): befähigt Stickstoff -nitrogen- zu fixieren

Erstmals beschrieben McCLUNG et al. (1983) diesen Keim, der aus der Wurzel des Salz-

Schlickgrases (*Spartina alterniflora*) isoliert werden konnte. Anfangs wegen der vielen gemeinsamen Eigenschaften noch der Gattung *Campylobacter* (*Campylobacter nitrofigilis*) zugeschrieben, erfolgte nach Einführung der neuen Gattung *Arcobacter* im Jahre 1991 folgerichtig die Umbenennung in *Arcobacter nitrofigilis* (VANDAMME et al., 1991).

Vertreter dieser Spezies sind gekrümmte Stäbchen mit einer Länge von 1 bis 3 µm und einer Breite von 0,2 bis 0,9 µm. Bei älteren Kulturen treten kokkoide Formen auf, die jedoch unter aeroben Bedingungen nur langsam wachsen. Eine polare Flagelle ermöglicht ihnen ein schnelles, korkenzieherartiges Fortbewegen. Sie bilden keine Schwärmkolonien und sind chemoorganotroph. Sauerstoff bildet im Atmungsmetabolismus den Elektronenakzeptor. Bei Anwesenheit von Aspartat und Fumarat wachsen sie anaerob. Zur Vermehrung benötigen sie NaCl, während das Wachstum in Medien mit 1 % Glycin (wt/vol) eingestellt wird. Einige Stämme tolerieren die Anwesenheit von 1 % Galle (wt/vol). Die Spezies bildet Katalase, Nitrogenase, Sulfatase und hydrolysiert Casein. (McCLUNG et al., 1983; VANDAMME et al., 1991)

### **2.2.3 *Arcobacter cryaerophilus***

*cryaerophilus* (Griechisch: cryo = Kälte, aero = Luft, philos = Freund): Freund von Luft und Kälte

*Campylobacter cryaerophila* wurde erstmalig im Jahre 1985 von NEILL et al. beschrieben. Aufgrund der Abgrenzung und Schaffung des neuen Genus *Arcobacter* erfolgte 1991 die Umbenennung in *Arcobacter cryaerophilus*. Es handelt sich um gekrümmte, S- oder korkenzieherähnliche Stäbchen mit einer Länge von 1,8 µm und einer Breite von 0,4 µm. Gelegentlich sind Vertreter mit > 20 µm Länge zu beobachten. Die bipolar monotriche Begeißelung ermöglicht ein schnelles, "pfeilartiges" Fortbewegen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30 °C. Auch bei Temperaturen um die 15 °C vermehren sich alle Stämme, wohingegen bei 5 °C und 42 °C nur wenige Isolate wachstumsfähig sind. Weiterhin sind anaerobe Bedingungen nur für einige Stämme förderlich. Die Kolonien zeigen sich klein, glatt und konvex, mit vollständigen Rändern. Das Vorkommen abgeflachter Kolonien unterschiedlicher Größen wird berichtet. Subkultivierte Stämme wachsen aerob, bei Anwesenheit von 10 % CO<sub>2</sub> und anaerob. Citrat, Malonat und Gluconat können von ihnen nicht verwertet werden. Sie sind fähig in Medien, die 4 % Glucose oder 0,1 % Glycin

enthalten, zu wachsen. Variabel im Wachstum zeigen sie sich in Substraten mit Natriumsuccinat. Keine Vermehrung findet in Kaliumcyanid (KCN) und auf Desoxycholatagar sowie in Medien mit 4 % NaCl statt. Auf Brucellaagar ohne Zugabe von Blut wächst *A. cryaerophilus* nur spärlich. Variabel erweist sich die Nitratreduktion und auch das Wachstum in Medien, die Nitrat enthalten. Die Art kann weder Schwefelwasserstoff aus Cystein noch Arginindecaboxylase bilden. Ebenso wenig ist ihr das Verflüssigen von Serum sowie die Hydrolyse von Casein und Tributyrin möglich. (NEILL et al., 1985; VANDAMME et al., 1991; KIEHLBAUCH et al., 1991a)

#### **2.2.4 *Arcobacter butzleri***

Diese Spezies wurde 1991 von KIEHLBAUCH et al. entdeckt und unter dem Namen *Campylobacter butzleri* beschrieben. Benannt ist sie nach Jean-Paul Butzler, einem belgischem Arzt und Mikrobiologen, als Anerkennung für seine Verdienste bei der Entdeckung von *Campylobacter*. Im Jahre 1992 erfolgte die Umbenennung in *Arcobacter butzleri*.

Bei *Arcobacter butzleri* handelt es sich um gekrümmte oder S-förmige Stäbchen mit einer Länge 1 bis 3 µm und einer Breite von 0,2 bis 0,4 µm. Nach dreitägiger Bebrütung auf Blutagarplatten bilden sich 2 bis 4 mm messende, überwiegend runde und meist weißliche Kolonien aus. Die Keime sind aerotolerant und vermehren sich unter anaeroben Bedingungen gering. Die monopolar bzw. bipolar monotriche Begeißelung ermöglicht ein schnelles, "pfeilartiges" Fortbewegen. Die Mikroorganismen wachsen bei 15 °C, 25 °C, 30 °C, 36 °C und 40 °C. Bei 42 °C zeigen sie ein unterschiedliches und bei 5 °C kein Wachstum. Sie gedeihen in Medien mit Natriumsuccinat sowie in VOGEL-BONNER-Minimalmedium (VB-Agar). Ein gutes Wachstum ist auch auf Heart-Infusion-Agar (HIA) und Brucellamedium mit und ohne Blut zu beobachten, variables Wachstum dagegen in Medien mit 0,04 % TTC. Auch die Schwefelwasserstoffbildung aus Cystein fällt unterschiedlich aus. *A. butzleri* besitzt eine schwache bzw. keine Katalase-Aktivität. (KIEHLBAUCH et al., 1991a; VANDAMME et al., 1992a)

### **2.2.5 *Arcobacter skirrowii***

*Arcobacter skirrowii* wurde im Jahre 1992 von VANDAMME et al. identifiziert und nach M. B. Skirrow benannt. Dieser britische Mikrobiologe hatte als erster ein einfaches routinetaugliches Nachweisverfahren für *Campylobacter jejuni* aus Stuhlproben entwickelt.

Bei dieser *Arcobacter*-Art handelt es sich um 1 bis 3 µm lange und 0,2 bis 0,4 µm breite Stäbchen. Nach drei Tagen Inkubation auf Blutagar zeigen sich gräulich runde Kolonien von 2 bis 3 mm Größe und flacher unregelmäßiger Form. Die optimale Wachstumstemperatur der Spezies liegt bei 37 °C. Variables Wachstum zeigt sich bei einer Temperatur von 42 °C. Auf VOGEL-BONNER-Minimalmedium ist Wachstum zu beobachten, jedoch in Medien mit 0,04 % TTC sind nur einige Stämme dazu befähigt. Aus Schwefelwasserstoff ist es ihnen nicht möglich Cystein zu bilden. (VANDAMME et al., 1992a)

### **2.2.6 *Arcobacter cibarius***

*cibarius* (Lateinisch): Lebensmittel betreffend

*Arcobacter cibarius* wurde von HOUF et al. im Jahre 2005 beschrieben. Bei diesem Erreger handelt es sich um leicht gekrümmte Stäbchen mit einer Länge von 1,5 µm und einer Breite von 0,5 µm. Nach 72-stündiger Inkubation auf Blutagar bei 28 °C unter mikroaeroben Bedingungen wachsen sie als weißliche, leicht konvexe, glatte, runde Kolonien mit einem Durchmesser von 2 mm. Auf *Arcobacter*-Selektivagar zeigen sich durchscheinende bis opake, glatte, runde Kolonien, mit einem Durchmesser von 1 - 2 mm. Unter mikroaeroben Bedingungen wachsen alle Stämme bei Raumtemperatur (18 - 22 °C) bzw. bei 37 °C sowie in Medien mit Kartoffelstärke sowie 0,02 - 0,05 % (w/v) Safranin, 0,032 % (w/v) Methylorange und 0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholat. Schwach vermehrt sich dieser Keim unter anaeroben Bedingungen auf 5 %igem Blutagar und Blutagar mit 0,1 % (w/v) Trimethylamin-N-Oxid. Variables Wachstum ist unter aeroben Bedingungen bei 25 °C sowie in Medien mit Tyrosin, 0,04 % TTC, 0,1 % Kaliumpermanganat, 0,001 % Natriumarsenat, Fuchsin basisch, Kristallviolett, Janusgrün und Natriumfluorid zu beobachten. In Medien, die Casein, 1 % Glycin, 2 - 4 % NaCl oder 0,2 % Pyronin enthalten, vermehren sie sich nicht. Ihre Katalasebildung verhält sich wenig einheitlich. (HOUF et al., 2005)

**2.2.7 *Arcobacter halophilus***

*halophilus* (Griechisch: hals, halos = Salz, philos = Freund): Freund von Salz

Diese Bakterienart wurde aus einer stark salzhaltigen Lagune im Laysan Atoll (nordwestliche Hawai'i-Inseln) isoliert und von DONACHIE et al. im Jahre 2005 beschrieben. Es handelt sich um gekrümmte, leicht spiralig gewundene Stäbchen mit einer Länge von 1,5 - 2,5 µm und einer Breite von 0,4 - 0,5 µm. Durch ihre polar monotriche Begeißelung sind sie frei beweglich. Nach 72-stündiger Inkubation bei 18 °C - 22 °C unter mikroaeroben und unter aeroben Bedingungen auf 5 %igem Blutagar mit 3,5 % NaCl wachsen glatte, grauweiße, runde Kolonien mit vollständigem Rand. Sie sind zudem leicht konvex, nicht schwärmend, ca. 1 - 2 mm groß und weisen eine klebrige Konsistenz auf. Unter mikroaeroben Bedingungen ist in Medien, die Kartoffelstärke, Tyrosin, Casein, 0,04 % TTC, 1 % Glycin, 0,1 % Kaliumpermanganat, 0,001 % Natriumarsenat, 0,02 - 0,05 % Safranin, 0,032 % Methylorange, 0,1 % Natriumdesoxycholat, 0,005 % Fuchsin basisch, 0,0005 % Kristallviolett, 0,01 % Janusgrün, 0,1 % Natriumfluorid oder 0,2 % Pyronin enthalten, kein Wachstum zu beobachten. Bei Konzentrationen von < 2 % NaCl oder < 0,1 % Kaliumnitrat (KNO<sub>3</sub>) vermehren sie sich nicht bzw. nur schlecht. (DONACHIE et al., 2005)

Eine Übersicht der charakteristischen Eigenschaften der bekannten *Arcobacter*-Arten enthält Tabelle 2.1.

**2.2.8 Übersicht der Charakteristika von *Arcobacter spp.***Tabelle 2.1.: Charakteristika von *Arcobacter spp.*

Test <sup>a</sup>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. ciberius</i>	<i>A. halophilus</i>
Wachstum bei:						
15 °C	+	+	/	+	/	/
25 °C	+	+	+	+	31	/
30 °C	+	+	+	+	/	/
37 °C, aerob	+	50	+	50	-	+ <sup>h</sup>
37 °C, mikroaerob	+	58	+	-	+	+ <sup>h</sup>
37 °C, anaerob	+	16-95	+	+	/	+ <sup>h</sup>
42 °C, mikroaerob	25-67 <sup>b</sup>	0-18 <sup>b</sup>	11-33 <sup>b</sup>	-	-	- <sup>h</sup>
anaerob + TMAO (Trimethylamin-N-Oxid)	+	11	-	+	+/-	/
Nähragar	+	+	+	+	+	-
gepuffertes Aktivkohle-Hefeextrakt-Medium	+	+	+	-	/	-
C.-Aktivkohle-Desoxycholat-Medium	+	95	+	-	+/-	-
C.-Minimal-Medium	+	-	-	-	+	-

## LITERATURÜBERSICHT

Test <sup>a</sup>	A. <i>butzleri</i>	A. <i>cryaerophilus</i>	A. <i>skirrowii</i>	A. <i>nitrofigilis</i>	A. <i>ciberius</i>	A. <i>halophilus</i>
MacConkey-Agar	83-100 <sup>b</sup>	16-43 <sup>b</sup>	-	-	+/-	-
Lezithin	75	16	11	-	+/-	-
Wachstum bei Anwesenheit von:						
Glycin 1 %	58	9-23 <sup>b</sup>	78	-	-	-
NaCl 2 %	92	84	+	+	-	+
NaCl 3,5 %	42-67	0-33 <sup>b</sup>	61	+	-	+
NaCl 4 %	-	-	+	+	-	+
Galle 2 %	+	79	+	-	/	/
Glucose 8 %	+	45-48	50	/	/	/
Pteridin 0/129 vibriostat	+	+	/	+	/	/
Cadmium-Chlorid (2,5 µg Blättchen)	r	s	/	/	/	/
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Katalase	33-100 <sup>b</sup>	+	+	+	54	-
Alphahämolyse	-	-	+	-	-	-
H <sub>2</sub> S-Produktion	0-25	0-11	-	-	-	-
Nitratreduktion	+	30-36	+	+	-	+
Glucoseverwertung	-	-	/	/	/	/
Hippursäurehydrolyse	-	-	-	-	-	-
Harnstoffhydrolyse	- <sup>d</sup>	-	-	+	-	-
DNase	0-92	0-72	22-100	100	-	-
Selenitreduktion	-	-	11	50	-	/
alkalische Phosphatase	-	-	-	-	-	-
Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid-Reduktion	+	95	77	-	-	-
Indoxylacetase	+	+	+	+	+	+
Pyrazinamidase	-	-	/	/	/	/
Resistenz ggü. Nalidixinsäure (30 µg B.)	14-25 <sup>b</sup>	0-17 <sup>b</sup>	-	-	+/- <sup>l</sup>	- <sup>l</sup>
Resistenz ggü. Cefalotin (30 µg B.)	83-100 <sup>b</sup>	72-100 <sup>b</sup>	+	0-22 <sup>b</sup>	+ <sup>l</sup>	- <sup>l</sup>
Resistenz ggü. Metronidazol <sup>c</sup> (4 mg/l)	92	+	+	-	/	/
Resistenz ggü. Carbenicillin <sup>c</sup> (32 mg/l)	+	+	+	-	+	-
Resistenz ggü. Cefoperazon <sup>c</sup> (64 mg/l)	+	+	+	-	+	-
Resistenz ggü. 5-Fluorouracil <sup>c</sup> (100 mg/l)	+	+	+	-	/	/
Guanin- und Cytosin-Gehalt (mol %)	29-31	28-29	29 <sup>g</sup>	28-29	26.8-28.2	/

B. = Blättchen; ggü. = gegenüber; r = resistent; s = sensitiv; / = nicht ermittelt, nicht getestet

<sup>a</sup> Tests für *Arcobacter spp.* bei 25 °C bzw. 37 °C soweit nicht anders festgelegt

<sup>b</sup> Quellenabweichungen

<sup>c</sup> getestet auf Blutagar

<sup>d</sup> einige Geflügelfleischisolate sind Urease-positiv (ATABAY, unveröffentlicht)

<sup>e</sup> einige Stämme von *A. skirrowii* sind negativ für Indoxyl-Acetat-Hydrolyse (ATABAY et al., 1998; ATABAY et al., 2001)

<sup>f</sup> Alpha-Hämolyse-positive Stämme von *A. butzleri* sind existent (ATABAY et al., 1998; ATABAY et al., 2001)

<sup>g</sup> Stammtyp

<sup>h</sup> getestet auf 5 %igem Blutagar mit 3,5 % NaCl

<sup>l</sup> Konzentration 32 mg/l

### Quellen:

1. Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Volume 37, J. E. L. CORRY, G. D. W. CURTIS und R. M. BAIRD, 2003, Chapter 18: "Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters"; J. E. L. CORRY, H. I. ATABAY, S. J. FORSYTHE und L. P. MANSFIELD
2. HOUF et al. (2005)
3. DONACHIE et al. (2005)

### 2.3 Virulenzfaktoren und Pathogenese

*Arcobacter* ist eine relativ neue Gattung und wird gewöhnlich noch nicht in routinemäßige Untersuchungen der Kliniken oder in industrielle Analysen einbezogen, sodass über ihre tatsächliche Bedeutung für die öffentliche Gesundheit wenig bekannt ist. Bisherige Studien bewerten diesen Erreger durchaus mit einem relativ großem Risiko für die Bevölkerung. So wurde beispielsweise *A. butzleri* aus dem Blut von Patienten mit Gastroenteritis sowie von Patienten mit Erkrankung der Leber isoliert. Ebenso erfolgte bei extraintestinalen Erkrankungen gelegentlich der Nachweis von *A. butzleri*. *A. cryaerophilus* hingegen fand sich bei Patienten mit Bakteriämie.

Für die Einschätzung des Gefahrenpotentials ist die Kenntnis der Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren von grundlegender Bedeutung. Obwohl vermutet wird, dass eine mögliche Korrelation zwischen *Arcobacter* und den jeweiligen Krankheitssymptomen besteht, liegen kaum Erkenntnisse über Pathogenitätsmechanismen, wie Adhäsion, Zellinvasion, Toxinbildung u.ä., vor.

FERNÁNDEZ et al. (1995) führten Studien zur Pathogenität an Rattendärmen durch. Die Autoren testeten zwei *A. cryaerophilus*-Isolate, die aus einem abortierten Rinderfötus und aus Schweinesekrementen isoliert worden waren. Es wurde beobachtet, dass sich die Ileumschlingen aufgrund von Flüssigkeitsansammlungen überdehnten und die Elektrolytkonzentration stieg. Die Isolate zeigten sich gegen 18 Stunden alte HEp-2-Zellen als enterotoxisch und -invasiv.

MUSMANNO et al. (1997) untersuchten die zytotoxische Wirkung auf INT 407-, CHO-, HeLa- und Vero-Zellen. Dabei verwendeten sie verschiedene *A. butzleri*-Isolate, die aus Flusswasserproben stammten. 17 der 18 getesteten Stämme zeigten eine zytotoxische Wirkung auf CHO- und Vero-Zellen sowie eine adhäsive Wirkung auf HeLa-Zellen. VILLARRUEL-LÓPEZ et al. (2003) bestätigten in ihren Arbeiten die Zytotoxizität gegen Vero-Zellen. Bei 95 % der untersuchten *Arcobacter*-Schweinefleischisolate konnte eine zytotoxische Wirkung auf Vero-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin induzierten 38 % der *Arcobacter*-Stämme eine Elongation, was einen Hinweis auf die Bildung von Enterotoxin gibt, 18 % der Isolate produzierten Vakuolen. In 39 % der Fälle wurden beide Pathogenitätsmerkmale beobachtet.

Das Ziel einer von JOHNSON und MURANO (2002) durchgeführten Studie war, *Arcobacter*-Isolate verschiedener Quellen auf das Vorhandensein der *C. jejuni* CDT-Gene zu überprüfen. In dem verwendeten PCR-Verfahren kamen Primer zum Einsatz, die der Genkodierung des CDT von *E. coli* und *C. jejuni* dienen. CDT (Cytolethal Distending Toxin) stellt ein von *Campylobacter*, *Helicobacter* und anderen Spezies gebildetes Zytotoxin dar. Es wird von den drei benachbarten Genen *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* codiert, die gemeinsam Bedeutung für die Toxinbildung besitzen. Die toxische Aktivität von CDT führt zur Blockade der Zellteilung eukaryotischer Zellen in der G<sub>2</sub>- bzw. in der frühen M-Phase, wodurch es zum Stillstand des Zellzyklus kommt und die betroffenen Zellen zugrunde gehen. In Zellkulturtests äußert sich die toxische Aktivität von CDT in einer auffälligen Vergrößerung der Zelleiber und -kerne etwa 24 Stunden nach Zugabe des Toxins. Während die CDT-behandelten Zellen weiter kontinuierlich anschwellen, setzen Disintegrationsprozesse ein, die nach etwa vier Tagen zur Apoptose führen. In der angesprochenen Untersuchung konnte aufgezeigt werden, dass die aus Umwelt-, Tier- und Humanproben stammenden *A. butzleri*- und *A. cryaerophilus*-Isolate weder CDT-Aktivität noch CDT-Gene besitzen. Andererseits konnten die bisherigen Studien bezüglich der zytotoxischen Wirkung auf CHO- und Vero-Zellen bestätigt werden. Als typisch zeigten sich Änderungen bei der Zellmorphologie, wie Elongation, Vakuolisieren und Abrunden der Zellen, sowie Zellkernpyknosen und Zellablösungen. Bei einem Stamm wiesen die Autoren auch zytotonisch-ähnliche Wirkung auf CHO-Zellen sowie adhäsive Wirkung auf HeLa-Zellen nach. Aus den Ergebnissen zogen JOHNSON und MURANO (2002) die Schlussfolgerung, dass von *Arcobacter* ein CDT-differentes Toxinmolekül (Molekulargewicht < 10 kDa) gebildet wird. Ob und welche Toxine diese Erreger bilden, bleibt weiterhin zu klären. (MUSMANNO et al., 1997; JOHNSON und MURANO, 2002; CARBONE et al., 2003; VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003)

Tabelle 2.2. fasst die In-vitro-Pathogenitätsstudien über *Arcobacter spp.* zusammen.

Tabelle 2.2.: In-vitro-Pathogenitätsstudien über *Arcobacter spp.*

	Probenmaterial	Ad-häsivität <sup>a</sup>	In-vasivität <sup>a</sup>	Cyto-toxizität <sup>a</sup>	Referenzen
<i>A. butzleri</i>					
Hep 2	Wasser (See)	6/17	-	-	CARBONE et al., 2003
	Faezes (Mensch)	12/12	4/12	3/12	VANDENBERG et al., 2004
Hela	Wasser (See)	6/17	-	-	CARBONE et al., 2003
	Wasser (Fluss)	1/18	0/8	-	MUSMANNO et al., 1997
	Wasser (Fluss)	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
	Tier und Mensch	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
INT407	Wasser (Fluss)	1/8	0/8	-	MUSMANNO et al., 1997

	Probenmaterial	Ad-häsivität <sup>a</sup>	In-vasivität <sup>a</sup>	Cyto-toxizität <sup>a</sup>	Referenzen
Vero	Wasser (Fluss)	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
	Tier und Mensch	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
	Wasser (Fluss)	-	-	17/18	MUSMANNO et al., 1997
	Wasser (See)	-	-	5/17	CARBONE et al., 2003
	Fleisch	-	-	76/80	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003
CHO	Wasser (Fluss)	-	-	17/18	MUSMANNO et al., 1997
<i>A. cryaerophilus</i>					
Hep-2	Faezes (Schwein)	-	1/1	-	FERNÁNDEZ et al., 1995
	abortierter Rinderfötus	-	1/1	-	FERNÁNDEZ et al., 1995
Hela	Wasser (Fluss)	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
	Tier und Mensch	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
INT407	Wasser (Fluss)	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
	Tier und Mensch	-	-	3/3	JOHNSON und MURANO, 2002
Vero	Fleisch	-	-	2/2	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003
<i>A. skirrowii</i>					
Vero	Fleisch	-	-	17/19	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003

(-) nicht getestet

<sup>a</sup> Anzahl positiver Proben/Anzahl getesteter Proben

Quelle: HO et al. (2006b)

Weitere Untersuchungen galten der Fähigkeit der Hämagglutination von *Arcobacter spp.* So testeten TSANG et al. (1996) zwei *Arcobacter*-Stämme an menschlichen und tierischen Erythrozyten und konnten mit Hilfe der Western-Immunoblot-Analyse das *Arcobacter*-Hämagglutinin identifizieren. Es handelt sich dabei um ein Lektin-ähnliches Protein von ca. 20 kDa, das mit einem D-Galaktose enthaltenen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Erythrozyten reagiert.

Neben den In-vitro-Versuchen fanden ebenso In-vivo-Pathogenitätsstudien statt: In einer Untersuchung von WESLEY et al. (1996) wurden "Eintagsferkeln" (per Kaiserschnitt entbunden) verschiedene *Arcobacter*-Stämme verabreicht. Die verwendeten *A. butzleri*-Stämme stammten aus menschlichen Exkrementen sowie aus den Faezes von Schweinen, der *A. cryaerophilus*-Stamm aus einem abortierten Rinderfötus und der *A. skirrowii*-Stamm von einem an Diarrhoe erkrankten Lamm. Es ließ sich beobachten, dass alle Stämme den Darm besiedelten und sich dort auch vermehrten, jedoch waren nur die *A. butzleri*-Isolate in der Lage, auch innere Organe zu befallen und die Tiere zu infizieren.

In einem weiteren Testdurchlauf wurden Unterschiede in der Inzidenz festgestellt. In dem ersten Testdurchlauf konnte bei allen vier mit *A. butzleri* infizierten Ferkeln der Erreger

nachgewiesen werden, wohingegen sich in dem zweiten Durchlauf nur noch bei zwei der vier Tiere *A. butzleri* isolieren ließen. Weiterhin zeigten die infizierten Tiere im ersten Durchlauf eine stärkere Belastung mit *A. butzleri* und *A. skirrowii* sowie eine höhere Mortalität: Fünf tote Tiere von acht im 1. Testdurchlauf standen kein totes Tier von acht im 2. Testdurchlauf gegenüber. Mögliche Ursache könnte eine altersbedingte Sensibilität sein. Obwohl alle Ferkel ein Tag alt waren und per Kaiserschnitt am 115. Tag der Trächtigkeit von den Sauen entbunden wurden, erschienen die Versuchstiere des ersten Experimentes weniger ausgereift.

In einer anderen Studie (WESLEY und BAETZ, 1999) wurden drei und fünf Tage alte Hühner und Puten mit einem *A. butzleri*-Humanstamm, der auch in der bereits beschriebenen "Ferkel"-Studie eingesetzt worden war, sowie mit *Arcobacter*-Stämmen, die aus Hühner- und Putenfleisch isoliert worden waren, oral infiziert. Bei den drei Tage alten Versuchstieren handelte es sich um Putenküken der hoch gezüchteten Beltsville-White-Linie und um nicht gezüchtete Hühnerküken der White-Leghorn-Linie. Die fünf Tage alten Tiere waren nicht gezüchtete Putenküken. In den Kloakentupfern und Gewebeproben der nicht gezüchteten Hühner (White Leghorn) und der nicht gezüchteten Puten war der Humanstamm nicht nachweisbar. Dagegen konnte eine hohe Anzahl von *A. butzleri* aus den Proben der gezüchteten Beltsville-White-Putenküken isoliert werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Invasivität und Virulenz der *A. butzleri*-Stämme wirtsabhängig sind und Infektionsversuche nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf andere *Arcobacter* belastete Wirte erlauben.

## 2.4 Nachweisverfahren

### 2.4.1 Kulturelle Verfahren zum Nachweis von *Arcobacter spp.*

Für den Nachweis von *Arcobacter* gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch kein normiertes, kulturelles Standardverfahren. 1977 isolierten ELLIS et al. zufällig aus abortierten Schweineföten ein spiralförmiges Bakterium, das der später eingeführten Gattung *Arcobacter* zugehörig war. Der Nachweis gelang mit Hilfe eines halbfesten Leptospiren-Selektivmediums (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris Polysorbate-80 - EMJH-P80 - unter Zusatz von 5-Fluorouracil). Seither wird an der Entwicklung von Selektivnährmedien und Isolierungstechniken gearbeitet, wobei die typischen Anforderungen an Nachweisverfahren, wie hohe Nachweissicherheit, Probenspezifität, Schnelligkeit, Selektivität, Eindeutigkeit, Unkompliziertheit und der Kostenfaktor, einzubeziehen sind. So mussten wichtige unterschiedliche Wachstumsbedingungen der eng verwandten Gattungen *Arcobacter* und *Campylobacter*, wie die Sauerstofftoleranz von *Arcobacter* sowie ihre Fähigkeit bei niedrigen Temperaturen ( $\leq 30\text{ °C}$ ) zu wachsen, bei der Entwicklung einer leistungsstarken, kulturellen Nachweismethode berücksichtigt werden: Die meisten der bisher für den Nachweis von *Arcobacter* beschriebenen Medien werden unter aeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen und bei Temperaturen von  $30\text{ °C}$  inkubiert. Trotz der einheitlichen Bebrütungsbedingungen zeigen die verschiedenen kulturellen Verfahren, wie sie für den Nachweis von *Arcobacter* entwickelt wurden, methodenimmanent unterschiedliche Nachweisraten.

1980 beschrieben NEILL et al. eine zweistufige Isolierungsmethode: In einem ersten Schritt beimpften sie EMJH-P80-Medium, dem  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  5-Fluorouracil zugesetzt wurde, mit Probenmaterial. Darauf folgte das Ausstreichen verdächtiger Kolonien auf Blutagar, der das Antibiotikum Carbenicillin enthielt.

COLLINS et al. (1996a) verwendeten für den Nachweis von *Arcobacter* in Schweinegehacktem als Anreicherungsmedium EMJH P-80 und als festen Selektivnährboden mCIN- bzw. CVA-Agar. Bei dem CIN-Agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) handelt es sich um ein Selektivmedium für *Yersinia spp.* Es stellt ebenso ein Nachweismedium für Leptospiren-Arten dar wie das zur Isolierung von *Arcobacter* verwendete EMJH P-80-Medium. Zwar wurde der CIN-Agar zunächst als geeignetes Medium zur Isolierung von *Arcobacter* empfohlen, es zeigte sich jedoch, dass dieser Keim

nicht so gut auf diesem Medium wächst. Die Autoren modifizierten deshalb den CIN-Agar unter Zugabe von 200 µg/ml 5-Fluorouracil und verschiedener Salze sowie unter Hinzufügen einzelner Agenzien nach einer Rezeptur von VANDAMME et al. (1992a). Der von COLLINS et al. (1996a) verwendete CVA-Agar enthält BHI-Agar, Rinderblut sowie Cefalotin, Vancomycin und Amphotericin B. Ein CVA-Agar mit einer ähnlichen Rezeptur, wobei u. a. Cefalotin durch das Antibiotikum Cefoperazon ersetzt ist, dient dem Nachweis von *Campylobacter*. Sowohl auf dem CVA- als auch dem modifizierten CIN-Agar war ein gutes bzw. verbessertes Wachstum zu beobachten, jedoch konnte die qualitative Selektion nicht befriedigen.

DE BOER et al. (1996) entwickelten für den Nachweis von *Arcobacter* aus Hühnerfleisch sowie Rinder- und Schweinegehacktem eine *Arcobacter*-Selektiv-Bouillon (ASB) und ein halbfestes *Arcobacter*-Selektiv-Medium (ASM). Beide Substrate enthalten die Selektivsubstanzen Cefoperazon, Piperacillin, Trimethoprim und Cycloheximid. Die Inkubation der Medien erfolgte unter aeroben Bedingungen für 48 h bei 24 °C. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur *A. butzleri* oder *A. butzleri*-ähnliche Stämme angezüchtet werden können.

Für die Untersuchung von frischem Geflügel und Geflügelprodukten auf *A. butzleri* verwendeten LAMMERDING et al. (1996) eine Anreicherungsbouillon, die ROSEF (1981) zum Nachweis von *C. jejuni* entwickelt hatte. Dieses Medium enthält Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, NaCl, Resazurin und Cefoperazon. Aus der Anreicherung wurden einzelne Tropfen, ca. 0,45 ml, mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit Filter (Porengröße von 0,45 µm und mit sehr niedriger Proteinbindung) auf modifizierten CCD-Agar mit Cefoperazon gegeben (mCCD-Agar: Charcoal-Cefoperazone-Desoxycholate-modified, für die Isolierung von *Campylobacter spp.*). Die Inkubation der Bouillon erfolgte mikroaerob und für das feste Selektivmedium aerob für 48 h bei 30 °C.

1997 verglichen ATABAY und CORRY CAT-Anreicherungssubstrat (*Campylobacter*-Anreicherungsbasalmedium - LabM, lysiertes Pferdeblut sowie Cefoperazon, Amphotericin B, Teicoplanin - CAT) mit der von LAMMERDING et al. (1996) entwickelten Nährbouillon. Das Anreicherungsmaterial wurde auf CAT-, mCCD- und Blutagar mit Hilfe der Filtrationstechnik nach LAMMERDING et al. (1996) sowie Membranfiltrationstechnik nach STEELE und McDERMOTT (1984) gebracht. Bei dem CAT-Agar handelt es sich um ein

Isolierungsmedium für thermophile *Campylobacter*. Es wurde beobachtet, dass der Nachweis von *Arcobacter spp.* nur nach erfolgter Anreicherung möglich ist. Ebenso konnten keine bzw. nur geringe *Arcobacter*-Raten über konventionelles Plattenausstreichen isoliert werden, wohingegen die Filtrationstechniken zu guten bis sehr guten Ergebnissen führten. Eine weitere Studie (CORRY und ATABAY, 1997) zur Effektivität von CAT- und mCCD-Agar ergab, dass sich mit beiden Medien *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* isolieren lassen. Dabei unterstützten die Supplemente C-A-T stärker das *Arcobacter*-Wachstum, insbesondere *A. butzleri*-Stämme, als das Hinzufügen von C-C-D. Als mögliche Ursache wurde die unterschiedliche Konzentration von Cefoperazon (CAT: 8 µg/ml und mCCD: 32 µg/ml) angesehen. Da aber *Arcobacter spp.* sich gegenüber der im mCCD-Agar verwendeten Cefoperazon-Konzentration resistent zeigte, wird in erster Linie von einem synergistischen Effekt zwischen Desoxycholat und Cefoperazon ausgegangen. (CORRY und ATABAY, 1997)

ATABAY und CORRY (1998) testeten ein *Arcobacter*-Anreicherungsmedium der Firma Oxoid und die beiden *Campylobacter*-Anreicherungsmedien PRESTON-Bouillon und Lab-M-BOLTON-Anreicherungsbouillon. Das *Arcobacter*-Medium wurde ursprünglich von ASPINALL et al. (1993) für die Isolierung thermophiler *Campylobacter*, einschließlich *C. upsaliensis*, entwickelt und enthält Pepton, Hefeextrakt, NaCl, Cefoperazon, Amphotericin B und Teicoplanin. In der Studie erwies sich dieses Substrat als das effektivere. Für alle drei getesteten Spezies, *A. butzleri*, *A. skirrowii* und *A. cryaerophilus*, wurde ein gutes Wachstum beobachtet. Basalmedium und Selektivagens sind heute kommerziell erhältlich (CM 965, SR 174 E Oxoid).

Verschiedene Nähr- und Zusatzstoffe der Nachweismedien für *Campylobacter*, *Helicobacter* und anderer gramnegativer Stäbchen verglichen JOHNSON und MURANO (1999a, b). Sie formulierten eine Rezeptur für ein Anreicherungs- und ein Nachweissubstrat zur Isolierung von *Arcobacter spp.* aus Geflügelfleisch. Selektivagenzien beider Medien sind Cefoperazon, Gallensalze und Thioglykolat. Die Nährbouillon (JOHNSON und MURANO, 1999b) enthält 5-Fluorouracil als weiteres antimikrobielles Agens. Inkubiert werden beide Medien unter aeroben Bedingungen bei 30 °C. In einem Vergleich mit ASB und ASM (DE BOER et al., 1996) sowie EMJH-P 80 + CVA-Agar erzielten die neu entwickelten Medien überragende Ergebnisse (JOHNSON und MURANO, 1999b). Bei der Bewertung muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Studie mit isolierten Stämmen und nicht an nativ

kontaminierten Lebensmitteln durchgeführt wurde. Ebenso wurden *A. skirrowii*-Stämme in diese Untersuchung nicht einbezogen, sodass über das Verfahren dieser Art keine Aussage getroffen werden konnte.

HOUF et al. (2001a) testeten an 101 *Arcobacter*-Stämmen (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*) die Antibiotika-Sensitivität. Die Verfasser beobachteten, dass *A. skirrowii* am empfindlichsten auf Antibiotika reagiert. Des Weiteren zeigten viele der *A. skirrowii*- und *A. cryaerophilus*-Stämme eine Sensibilität gegenüber 64 µg/ml Piperacillin, eine Konzentration, die etwas unterhalb von der im DE BOER-Selektivmedium (75 µg/ml) verwendeten Menge liegt. Der Befund könnte durchaus erklären, weshalb mit diesem Medium nur *A. butzleri* nachzuweisen ist. Weiterhin vermuteten HOUF et al. (2001a), dass eine Cefoperazon-Konzentration von 32 µg/ml, die von einigen Autoren angegeben wird, *A. cryaerophilus*- und *A. skirrowii*-Zellen schädigt und sich nachteilig auf deren Wachstum auswirkt. Der ermittelte MIC-Wert lag nur wenig über dieser Konzentration. Ebenso kamen die Autoren zu dem Schluss, dass sich die von COLLINS et al. (1996a) beschriebenen Selektivmedien mit den Supplementen CVA und CIN nur für den Nachweis von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*, nicht jedoch für den von *A. skirrowii* eignen. Studien von KIEHLBAUCH et al. (1992) konnten diese Vermutungen bekräftigen.

Obwohl die für Vancomycin, einem in seiner Wirkung mit Teicoplanin (enthalten im CAT-Supplement) vergleichbarem Antibiotikum, ermittelte MIC vermuten lässt, dass sich das von ATABAY und CORRY (1998) beschriebene Medium für das Wiederfinden von *Arcobacter* eignet, reicht sie aber nicht aus, die konkurrierende Begleitflora in den zu untersuchenden Lebensmitteln zu unterdrücken. Ebenso trifft dies für die im EMJH-Medium verwendeten 5-Fluorouracil-Konzentration zu. HOUF et al. (2001a) stellten weiterhin fest, dass sich 5-Fluorouracil, Novobiocin, Trimethoprim und Teicoplanin oder Vancomycin in den richtig abgestimmten Konzentrationen sehr gut als antimikrobielle Agenzien für ein *Arcobacter*-Selektivmedium eignen und entwickelten auf den Ergebnissen basierend eine Rezeptur für eine Anreicherungsbouillon und ein festes Selektivmedium. Mit diesen beiden Nährmedien lassen sich die drei wichtigsten *Arcobacter*-Spezies isolieren, wobei sich ein besseres Wachsen von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* gegenüber *A. skirrowii* beobachten lässt, was in der von diesen Keimen länger benötigten Inkubationszeit (bis zu 7 Tagen) begründet liegen mag. (HOUF et al., 2001b)

OHLENDORF und MURANO (2002a, b) verglichen die Isolierungsverfahren von COLLINS et al. (1996a), DE BOER et al. (1996) sowie JOHNSON und MURANO (1999a, b) und stellten fest, dass alle drei Medien besser *A. butzleri* als *A. cryaerophilus* nachwiesen, wobei die JOHNSON-MURANO-Methode sensibler war: Bei  $10^1$  CFU/g wurden *A. butzleri* in 100 % der Proben und *A. cryaerophilus* in 75 % der Proben erfasst. Ebenso zeigten die beiden anderen Medien eine unzureichende Selektivität für *Arcobacter*. Das Wachstum konkurrierender Begleitflora konnte nicht ausreichend unterdrückt werden, was das Selektieren von *Arcobacter* erschwert bzw. verhindert.

In einer Vergleichsstudie von SCULLION et al. (2004) wurden die Isolierungsverfahren nach ON et al. (2002), HOUF et al. (2001b), JOHNSON und MURANO (1999a, b) und die von ihnen modifizierte JOHNSON und MURANO-Methode getestet. Bei der letztgenannten wurde das Anreicherungsmedium aus der JOHNSON und MURANO-Bouillon sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden auf das feste JOHNSON-MURANO-Selektivmedium überimpft. Mit dieser Modifikation konnte die Isolierungsrate gegenüber der üblichen JOHNSON-MURANO-Methode um 18 % erhöht werden. Obwohl die HOUF-Methode und die modifizierte JOHNSON-MURANO-Methode gleich hohe Nachweisraten erzielten, gab es in der Verteilung der positiven Proben signifikante Unterschiede. Das Verwenden von nur einer der beiden Methoden hätte bei ca. 25 % der Proben zu einem falsch negativen Ergebnis geführt.

#### **2.4.2 Genotypische Differenzierungsmethoden für *Arcobacter* spp.**

Als Ergänzung klassischer Verfahren wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Methoden entwickelt, die auf den genotypischen Nachweis der Erreger basieren. Gemeinsame Grundlage dieser Methoden ist ein Nachweis auf genetischer Ebene, der weder vom Wachstumsstadium der Mikroorganismen noch von den Umwelteinflüssen abhängt und somit als sehr spezifisch angesehen werden kann. Je nach der Spezifität eines Nachweissystems können verschiedene Regionen des Genoms als Zielregion verwendet werden. So wird entweder ein gattungs-, art- oder speziesspezifischer Nachweis möglich.

Die Entwicklung und Anwendung der ersten molekularen Diagnostik-Methoden zur Detektion von *Arcobacter* spp. ermöglichten die Spezifizierung von *C. cryaerophila* 1A/1B sowie *C. butzleri* und brachten den neuen Genus *Arcobacter* hervor. Diagnose-unterstützende

Verfahren waren dabei RFLP, Ribotyping, DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierung sowie SDS-PAGE (KIEHLBAUCH et al., 1991a und b; VANDAMME et al., 1990, 1991, 1992a). Zur Identifizierung der Gattung *Arcobacter* entwickelten BASTYNS et al. (1995) ein genusspezifisches PCR-Analyseverfahren, als Zielsequenzen wurden 23S rRNA-Gene überprüft. Sie entwarfen für *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* speziesspezifische Primer: CRYAE, SKIR und BUTZ. Die PCR ist ein geeignetes In-vitro-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Segmentes, das von zwei Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird, die jeweils am Ende des zu vervielfältigenden Abschnittes liegen. Die Natur der amplifizierten DNA kann unter Verwendung geeigneter Sonden, zum Beispiel durch DNA-DNA-Hybridisierung, analysiert werden. Die DNA-Amplifikation über PCR ist eine schnelle und automatisierbare Methode.

HARMON und WESLEY (1996) entwickelten für den Nachweis von *Arcobacter* ein multiplex PCR-Verfahren kombiniert mit Oligonukleotid-DNA-Sonden. Die von ihnen verwendeten Primer dienen der Entschlüsselung von 16S rDNA-Gensequenzen. In einer weiteren Studie entwarfen sie für den spezifischen Nachweis von *A. butzleri* neue Primer. Zur Abgrenzung der *Arcobacter spp.* erweist sich ihre Methode als sehr nützlich, ermöglicht jedoch keine Differenzierung der Stämme (HARMON und WESLEY, 1997).

MARSHALL et al. (1999) stellten zwei neue Primer für die PCR-RFLP-Analyse her. Als Zielsequenz werden 16S rRNA-Gene überprüft, was die Identifizierung von 158 *Arcobacter*-, *Campylobacter*- und *Helicobacter*-Isolaten ermöglicht. Obwohl die PCR-RFLP-Analyse zu einem sehr schnellen und effektiven Selektieren führt, ist sie für die Routineuntersuchung wenig praktikabel.

GONZÁLEZ et al. (2000) beschrieben für den Nachweis von *Arcobacter spp.* in frischem Hühnerfleisch ein Verfahren, bei welchem einer kurzen Selektivanreicherung die Extraktion und Verlängerung eines 181 bp Fragmentes der 16S rRNA-Sequenz unter Verwendung Digoxigenin-markierter Primer folgt. Wird diese Methode mit einem ELISA kombiniert, ist eine quantitative Bestimmung der Erreger möglich. Für den quantitativen und qualitativen Nachweis von *Arcobacter* in Lebensmitteln zeigte sich in vergleichenden Untersuchungen mit kulturellen Isolierungsmethoden das PCR-ELISA-Verfahren als sehr schnell und sensitiv

(ANTOLÍN et al., 2001).

HOUF et al. (2000) synthetisierten Primer, mit denen *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* simultan über mPCR nachgewiesen bzw. differenziert werden können. Während der PCR-Reaktionen werden 16S rRNA- und 23S rRNA-Genbereiche verlängert. Die Extraktion der DNA-Matrix ist direkt aus der Anreicherungsbouillon möglich und verkürzt erheblich die Nachweiszeit.

ATABAY et al. (1998, 2002, 2003) nutzten für die Identifizierung von *A. butzleri* die SDS-PAGE-Methode. Dabei werden Proteine bzw. Polypeptide entsprechend ihrem Molekulargewicht von denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Mit Hilfe der RAPD-PCR (PCR mit relativ unspezifischen, kurzen Primern) war es möglich, von 35 *A. butzleri*-Isolaten aus Hühnerschlachtkörpern elf eindeutige DNA-Profile zu erstellen.

Zur Verbesserung der ERIC-PCR (PCR mit Primern, die an repetitiven Sequenzen binden) und der RAPD-PCR testeten HOUF et al. (2002a, 2003) eine einfache und schnelle DNA-Extraktionsmethode, die für beide Methoden eingesetzt werden kann. Diese Diagnostikverfahren erzielten gute Ergebnisse, wobei die genetischen "Fingerabdrücke" über ERIC-PCR reproduzierbarer und komplexer waren. Den Autoren war es mit diesen Verfahren möglich, 1079 *Arcobacter*-Isolate aus belgischen Geflügelschlachtkörpern in 159 *A. butzleri*- und 139 *A. cryaerophilus*-Typen zu differenzieren.

Obwohl die DNA-PCR-Nachweisverfahren wesentliche Zeitersparnis bringen, stellt in der Lebensmittelhygiene für die meisten relevanten Krankheitserreger die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) im Allgemeinen den "goldenen Standard" dar. HUME et al. (2001) typisierten mittels dieses Verfahrens (Restriktionsendonukleasen *EagI*, *SacII*, *SmaI*) *Arcobacter*-Isolate laktierender Sauen und heranwachsender Schweine. Es konnte eine hohe genetische Varianz beobachtet werden, die darauf schließen lässt, dass sich die *Arcobacter*-Flora während der Lebens- und Wachstumsphasen genetisch umgestaltet. RIVAS et al. (2004) differenzierten mit Hilfe der PFGE die aus Hühner-, Schweine-, Rind- und Lammfleisch isolierten *Arcobacter*-Stämme und stellten fest, dass bei einer Vielzahl der Isolate die genetischen "Fingerabdrücke" übereinstimmten.

KABEYA et al. (2003b) entwickelten zur Identifizierung von *Arcobacter* ssp. eine

speziesspezifische PCR-Analyse, bei der Primer die 23S rRNA-Genbereiche verlängern. Mit dieser Methode ließen sich *A. cryaerophilus* 1A und 1B differenzieren, was bisher nur mit Hilfe der DNA-DNA-Hybridisierung gelang (KIEHLBAUCH et al., 1991b). Für die epidemiologische Analyse von *Arcobacter*-Infektionen ist es ein hilfreiches, einfaches und schnelles Verfahren.

ON et al. (2003) verwendeten für den Nachweis von *Arcobacter spp.* die AFLP-Analyse. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass zeitgleich *Campylobacter spp.* nachgewiesen werden können. Somit erweist sich dieses Verfahren nicht nur für die taxonomischen und epidemiologischen Analysen von *Arcobacter* als sehr nützlich, sondern es ermöglicht auch eine duale Analyse medizinisch wichtiger und taxonomisch verwandter Erreger.

Ein einfaches, zeitsparendes PCR-RFLP-Verfahren zur simultanen Differenzierung der drei Gattungen *Helicobacter*, *Campylobacter* und *Arcobacter* beschrieben GONZÁLEZ et al. (2006). Unter Verwendung nur eines Primersatzes und eines Restriktionsenzym wurden 16S und 23S rRNA-Gensequenzen analysiert. Im Gegensatz zu den konventionellen Nachweisverfahren bildet diese Methode für die zuverlässige Charakterisierung der drei Gattungen eine sichere und geeignete Alternative.

BRIGHTWELL et al. (2007) entwickelten für den Nachweis von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* eine neue mPCR-Analyse und die erste TaqMan-RT-PCR. Für die mPCR wurde ein von HOUF et al. (2000) beschriebenes *A. cryaerophilus*-Primerpaar (Zielsequenz 23S rRNA-Gene) sowie das in der Studie neu synthetisierte *A. butzleri*-Primerpaar, welches den bekannten DNA-Genabschnitt *rpoB-rpoC* nachweist, verwendet. In derselben Untersuchung stellten die Wissenschaftler zwei TaqMan-Assays für die Überprüfung der Gensequenzen *rpoB-rpoC* und 23S rRNA von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* her. Im Vergleich der beiden Methoden zeigte die TaqMan-Analyse eine Verbesserung in Probendurchlauf und Sensitivität (< 10 CFU pro PCR-Reaktion und > 2 log Sensitivität).

## 2.5 Epidemiologie und Vorkommen von *Arcobacter spp.*

### 2.5.1 Epidemiologie und Vorkommen beim Menschen

Nach *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. upsaliensis* stellt *Arcobacter butzleri* den vierthäufigsten *Campylobacter*-ähnlichen Erreger dar, der aus den Fäzes von Patienten in Belgien und Frankreich isoliert wurde (VANDENBERG et al., 2004; PROUZET-MAULÉON et al., 2006). Dabei trat in 20 % der *A. butzleri*-positiven Proben eine Co-Kontamination mit anderen Enteropathogenen auf. *A. butzleri* wurde auch häufiger in Proben von Patienten mit Diarrhoe als in Proben von Patienten ohne Diarrhoe nachgewiesen. Als weiterer Vertreter der Gattung *Arcobacter* wurde *A. cryaerophilus* isoliert, während *A. skirrowii* nicht nachgewiesen wurde.

Über den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Arcobacter spp.* und gastrointestinalen Krankheiten beim Menschen liegen auch Studien aus weiteren Ländern vor. So wurde 1983 während eines Krankheitsausbruchs in einem italienischen Kindergarten und einer Grundschule bei den Kindern als einziger potentieller Erreger *A. butzleri* nachgewiesen. Die zehn infizierten Kinder, sechs Mädchen und vier Jungen, litten wiederholt unter abdominalen Krämpfen. Bei drei Kindern trat zusätzlich Erbrechen auf und bei einem Kind zeigte sich Fieber. Jedoch entwickelte keiner der Patienten eine Diarrhoe (PUGINA et al., 1991; VANDAMME et al., 1992b). In Thailand hingegen wurde *A. butzleri* bei Kindern mit Diarrhoe nachgewiesen (TAYLOR et al., 1991). In einer Studie von TEE et al. (1988) in Australien wurde *A. cryaerophilus* bei einem 35 Jahre alten Mann festgestellt, der unter Abdominalkrämpfen und intermittierender Diarrhoe litt. Weitere enterische Pathogene ließen sich nicht isolieren. In Deutschland sind bei zwei Patienten, einer 52-jährigen Frau sowie einem 48-jährigen Mann, Abdominalkrämpfe und Durchfall aufgetreten, die auf *A. butzleri* zurückgeführt wurden (LERNER et al., 1994). Der erste Nachweis von *A. skirrowii* bei einem Menschen erfolgte im Jahre 2004. Es handelte sich hierbei um einen 73 Jahre alten Patienten mit persistierender Diarrhoe (WYBO et al., 2004). Welche Bedeutung jedoch *A. skirrowii* bei Erkrankungen des Menschen besitzt, ist unklar, aber das Risiko wird nicht hoch eingeschätzt.

Eine weitere Erkrankung, mit der *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* in Verbindung gebracht wird, ist die Bakteriämie. Einige Fälle beim Menschen sind dokumentiert, so zum Beispiel drei ältere Personen, von denen zwei chronisch erkrankt waren. Bei der ersten Patientin

handelte es sich um eine 72-jährige Frau mit Urämie, Fieber, progressivem Husten und eitrigem Auswurf sowie pleuritischen Thoraxschmerzen. Aufgrund eines Adenokarzinoms hatte sie sich drei Jahre zuvor einer Gastrektomie unterzogen. Umfangreiche biochemische Analysen sowie Antibiotikaempfindlichkeitstests ergaben, dass es sich bei dem Erreger um *A. cryaerophilus* handelte. Die Infektion erfolgte über eine infizierte artriovenöse Fistel, die ihr wegen chronischen Nierenversagens implantiert worden war (HSUEH et al., 1997). Bei dem zweiten Patienten handelte es sich um einen 60 Jahre alten Mann, der an Leberzirrhose erkrankt war und unter hohem Fieber und Blutungen aus Ösophagusvarizen litt. Die Blutuntersuchung ergab *Campylobacter*-ähnliche Bakterien, die über Sequenzanalyse der 16S rRNA als *A. butzleri* identifiziert wurden. Die Infektionsquelle und der Übertragungsweg konnten nicht geklärt werden (YAN et al., 2000). Die dritte Patientin, eine 69-jährige Frau, war an akuter gangränöser Appendizitis erkrankt. Sie litt unter Fieber und hatte Schmerzen im rechten unteren abdominalen Quadranten. Die Infektion erfolgte über orale Aufnahme (LAU et al., 2002).

Eine vertikal-transplazentare Übertragung wurde bei einem an Bakteriämie erkrankten Neugeborenen vermutet. Als Erreger wurde *A. butzleri* nachgewiesen. Bei der Mutter traten aufgrund einer Placenta praevia (Zervixplazenta) wiederkehrende Blutungen auf, jedoch waren keine Anzeichen einer Infektionskrankheit zu beobachten (ON et al., 1995). Ein sehr gravierender Fall einer Bakteriämie zeigte sich bei einem siebenjährigen Jungen. Nach dem dieser in ein Schlammloch fiel, kam es zu einer akuten Atemnot, einer disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) und einem akuten Nierenversagen, an deren Folgen das Kind verstarb. Aus seinem Blut wurde *A. cryaerophilus* isoliert. Es bestand die Vermutung, dass der Erreger mit dem Schlamm aufgenommen wurde und die Infektion über die Atemwege erfolgte (WOO et al., 2001). Von diesem dramatischen Zwischenfall abgesehen, sind *Arcobacter*-Infektionen hauptsächlich bei Patienten mit chronischen Erkrankungen zu beobachten. In einer von VANDENBERG et al. (2004) durchgeführten Studie reichte das Alter der Patienten, die an Diarrhoe erkrankt waren und bei denen *A. butzleri* nachgewiesen wurde, von 30 Tagen bis zu 90 Jahren. In 16 % der Fälle lagen Immunschwäche und andere chronische Krankheiten vor.

Die von *A. butzleri* hervorgerufene Diarrhoe scheint hartnäckiger, wässriger und asymptomatischer sowie nicht so akut wie die von *C. jejuni* hervorgerufene Form zu sein (VANDENBERG et al., 2004). Neben der typischen Übertragung im Falle der Bakteriämie

und der möglichen Mund-zu-Mund-Übertragung (italienischer Kindergarten/Schule) erfolgt die *Arcobacter*-Infektion beim Menschen wie bei anderen enterischen Bakterien vermutlich auch auf oralem Wege durch Aufnahme von kontaminierter Nahrung oder Wasser.

## **2.5.2 Epidemiologie und Vorkommen beim Tier**

### **2.5.2.1 Nachweis aus klinischem Material**

In den 70er Jahren wurden aerotolerante *Campylobacter*-ähnliche Mikroorganismen aus abortierten Rinder- und Schweineföten isoliert (ELLIS et al., 1977, 1978; NEILL et al., 1979). Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich um Vertreter einer eigenen Gattung handelte, weshalb der neue Genus *Arcobacter* in die Familie *Campylobacteraceae* eingeführt wurde. Seither wurden Stämme von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* aus abortierten Föten und Plazenten von Rindern, Schweinen und Schafen isoliert (VANDAMME et al., 1991; VANDAMME und DE LEY, 1991; VANDAMME et al., 1992a). In US-amerikanischen und brasilianischen Studien an abortierten Schweineföten konnte *A. cryaerophilus* als die dominierende *Arcobacter*-Spezies nachgewiesen werden (SCHROEDER-TUCKER et al., 1996; DE OLIVEIRA et al., 1997). Dagegen wurden in Dänemark *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* aus 41,8 % der abortierten Schweineföten mit einer verhältnismäßig gleich hohen Nachweisrate (40,7 % bzw. 37 %) isoliert. Es wurde vermutet, dass die Diskrepanz in der Nachweisrate geographisch und/oder methodisch begründet sein könnte (ON et al., 2002).

Neben dem Porzinen Parvovirus (PPV) und dem Porzinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV) gehört *Arcobacter spp.* zu den Erregern, die am häufigsten mit reproduktiven Störungen bei Schweinen in Verbindung gebracht werden. Krankheitsbilder wie Infertilität, chronischer Ausfluss während des Östrus, chronische Totgeburten und Aborte während der fortgeschrittenen Gravidität können dabei mit *Arcobacter*-Infektionen assoziiert werden (SCHROEDER-TUCKER et al., 1996). Da in der Präputialflüssigkeit von Bullen *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* und in der von Wild- und Mastschweinen *A. skirrowii* nachgewiesen wurden, wird über eine venerische Übertragung diskutiert (DE OLIVERIA et al., 1999; VANDAMME et al., 1992a).

1982 wurden in Gemelkproben von Mastitis erkrankten Tieren aerotolerante *Campylobacter*

gefunden und später als *A. cryaerophilus* identifiziert. Eine experimentelle Infektion der Euter gesunder Kühe mit diesem Erreger verursachte eine akute klinische Mastitis mit Fieber und deutlichem Rückgang der Milchleistung (LOGAN et al., 1982).

Da *Arcobacter spp.* auch bei klinisch gesunden Sauen und neugeborenen lebenden Ferkeln nachgewiesen wurde, sind wahrscheinlich nur einige *Arcobacter*-Stämme für Aborte und Reproduktionsstörungen von entscheidender Bedeutung, während es sich bei anderen lediglich um opportune Erreger handelt (ELLIS et al., 1978; ON et al., 2002; HO et al., 2006a). Wie sich diese Unterschiede in der Virulenz widerspiegeln, ist unbekannt. Ebenso wird noch zu klären sein, welche Rolle *Arcobacter spp.* letzten Endes für chronische Reproduktionsstörungen der Nutztiere spielt.

Neben den reproduktiven Störungen wird *Arcobacter* auch mit Enteritis und Diarrhoe in Verbindung gebracht. *A. butzleri* wurde aus den Fäkalien von an Durchfall erkrankten Schweinen, Rindern, Pferden, Straußen und Schildkröten isoliert. *A. skirrowii* wurde bei Schafen und Kühen, die unter Diarrhoe und hämorrhagischer Kolitis litten, nachgewiesen (VANDAMME et al., 1992a; VANDAMME, 2000). Auch erfolgten Untersuchungen über den Zusammenhang von *A. butzleri* und Durchfallerkrankungen an niederen Primaten. ANDERSON et al. (1993) identifizierten bei 14 der 222 untersuchten Makaken (Alter > sechs Monate) *A. butzleri*. Bei sieben dieser Tiere lag eine Co-Infektion mit *C. coli* (5 von 7) und *C. jejuni* (2 von 7) vor. Andere potentielle enterische Erreger waren nicht nachweisbar. Die histologischen Untersuchungen der Darmproben zeigten typische Merkmale akuter und chronischer Entzündungen, identisch mit denen von *Campylobacter*-Kolitiden. Mittels Ribotyping konnten aus den 14 Isolaten 9 Stämme differenziert werden: 8 verschiedene Stämme wurden bei Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und ein Stamm wurde bei Stummelschwanzaffen (*Macaca arctoides*) nachgewiesen. Der am häufigsten vorkommende Stamm, Ribotyp A, fand sich bei einem Javaneraffen (*Macaca fascicularis*), bei einem Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) und bei drei Rhesusaffen. Diese Daten legen nahe, dass *A. butzleri* in dieser Primatenpopulation endemisch verbreitet sein dürfte und ein Infektionsherd unwahrscheinlich ist. (ANDERSON et al., 1993; HIGGINS et al., 1999)

### 2.5.2.2 Nachweis bei klinisch gesunden Tieren

Dass die Anwesenheit von *Arcobacter spp.* nicht immer mit einer Infektion einhergeht, zeigt der Nachweis von *Arcobacter spp.* aus dem Verdauungstrakt von Nutztieren, bei denen keine Krankheitssymptomatik zu beobachten war (HUME et al., 2001). Ebenso zeigten sich Fäkalproben gesunder Rinder, Schweine, Hühner, Schafe und Pferde mit *Arcobacter* kontaminiert (HUME et al., 2001; KABEYA et al., 2003b; ÖNGÖR et al., 2004; VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2004, 2005). Obwohl die Nachweisraten variierten, war festzustellen, dass *Arcobacter spp.* häufiger bei Schweinen als bei Rindern vorkam. Ein einjähriges Monitoring in einem japanischen Schlachtbetrieb ergab, dass 3,6 % der Fäkalproben der Rinder bzw. 10 % der Schweineproben positiv für *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* oder *A. skirrowii* ausfielen (KABEYA et al., 2003b). In Belgien waren es 39 bzw. 44 % (VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2004). In Untersuchungen belgischer Viehbestände konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Schweine, insbesondere gesunde Sauen, hoch mit *Arcobacter spp.* belastet waren: Bei 59 % der tragenden Sauen und 85 % der abgeferkelten Sauen wurde *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* nachgewiesen (VAN DRIESSCHE et al., 2004, 2005). Auf einer Schweineaufzuchtfarm in den Niederlanden waren 42 % der Sauen mit *Arcobacter* infiziert, wobei die Spezies *A. skirrowii* dominierte (HO et al., 2006a). Dieser Befund stellt in der Literatur eher die Ausnahme dar. Obwohl auch VAN DRIESSCHE et al. (2005) in einer Studie an Rindern *A. cryaerophilus* mit der höchsten Nachweisrate, gefolgt von *A. butzleri*, isolierten, bildete bei anderen Erhebungen im Allgemeinen *A. butzleri* die dominierende Spezies, gefolgt von *A. cryaerophilus* (WESLEY et al., 2000; HUME et al., 2001; VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2005; KABEYA et al., 2003b; ÖNGÖR et al., 2004).

Des Weiteren kommt die Spezies nur selten isoliert vor. VAN DRIESSCHE et al. (2005) wiesen in 26 % der Rinderfäkalien mehr als eine Art nach, bei Einzeltieren (Schwein/Kuh) sogar bis zu drei *Arcobacter*-Arten. Ebenso ließ sich innerhalb der Spezies eine hohe genetische Varianz feststellen. So konnten in Untersuchungen auf vier Schweinefarmen von den 322 *A. butzleri*-, 121 *A. cryaerophilus*- und 35 *A. skirrowii*-Isolaten jeweils 123, 70 und 30 Genotypen differenziert werden. Bei Einzeltieren ließen sich bis zu sieben *A. butzleri*-, zehn *A. cryaerophilus*- und sechs *A. skirrowii*-Genotypen isolieren. In einer weiteren Studien auf drei Rinderfarmen war eine gleich hohe Heterogenität zu beobachten: Die 36 *A. butzleri*-, 164 *A. cryaerophilus*- und 78 *A. skirrowii*-Isolate konnten in 5, 96 und 68 Genotypen aufgeteilt werden. Allein bei einem Einzeltier waren sechs *A. cryaerophilus*- und zwei

*A. skirrowii*-Genotypen nachzuweisen (VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2004, 2005). Eine genotypische Vielfalt der *Arcobacter*-Isolate bestätigten auch Studien an Geflügelprodukten. Von 182 bzw. 552 *A. butzleri*- und 46 bzw. 280 *A. cryaerophilus*-Isolaten wurden 91 bzw. 97 *A. butzleri*- und 40 bzw. 121 *A. cryaerophilus*-Genotypen differenziert (HOUF et al., 2002b, 2003).

Obschon Hühnerfleisch relativ hoch mit *Arcobacter spp.* kontaminiert ist, kann dieser Erreger relativ selten aus dem Verdauungstrakt dieser Tiere isoliert werden. ATABAY und CORRY (1997) prüften den Inhalt von Muskelmägen, Dün-, Blind- und Dickdärmen *Arcobacter*-positiver Schlachtkörper und wiesen nur in einer Probe *Arcobacter spp.* nach. WESLEY und BAETZ (1999) nahmen von Hühnern und Puten Kloakenabstriche und machten folgende Feststellung: Nur 1 % (n = 105) der acht Wochen alten Hühner (32 % derselben Gruppe zeigten sich *Campylobacter*-positiv) sowie 3 % (n = 98) der 16 Wochen alten Hühner einer Herde und keines der 28 Wochen alten Hühner aus neun weiteren Herden zeigten eine Kontamination mit *Arcobacter spp.* In einem Experiment infizierten die Wissenschaftler drei und fünf Tage alte Hühner und Puten oral mit verschiedenen *A. butzleri*- und *C. jejuni*-Stämmen. Weder die Kloaken- noch die Gewebeproben der Hühner waren später (zehn Tage postinfektiös) mit *Arcobacter* kontaminiert. Bei den Kloaken- bzw. Gewebeproben der Puten zeigten sich in 2,9 % bzw. 6 % der Fälle eine *A. butzleri*-Belastung (fünf Tage postinfektiös). *C. jejuni* wurde sowohl bei den Hühner- als auch Puten-Kloakenproben nachgewiesen. Ebenso stellten HOUF et al. (2002b) trotz einer hohen Oberflächenkontamination der Schlachtkörper (Masthähnchen), die sogar über der von *Campylobacter lag*, keine *Arcobacter spp.* im Dickdarminhalt fest. EIFERT et al. (2003) infizierten eine Woche alte Hühner mit unterschiedlich hohen *A. butzleri*-Dosen ( $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^9$  CFU/Vogel; für drei, fünf und sieben Wochen). Es zeigte sich, dass die Tiere diesen Erreger nur bei den höchsten Infektionsdosen ausschieden ( $10^6$  und  $10^9$  CFU/Vogel). Interessanterweise erbrachten bei einer Konzentration von  $10^9$  CFU/Vogel die drei, fünf und sieben Wochen alten Gruppen 22 % (20 %, 25 %, 20 %; 40 Tiere pro Gruppe) *Arcobacter*-positive Kloakentupfer, während bei Vergleichsgruppen (zwei, vier und sechs Wochen alte Tiere) im gesamten Darm kein *Arcobacter* nachzuweisen war. Eine statistische Analyse der Ergebnisse ergab einen signifikant höheren Prozentsatz positiver Oberflächenproben gegenüber den positiven Fäkaltupfern. Obwohl *Arcobacter spp.* fakultativ anaerob ist und in der Umgebung eine längere Zeit überleben und sich vermehren kann, wurde dieser Erreger bei fast allen untersuchten Schlachtkörpern nicht im Darm, jedoch in den Kloakenproben

nachgewiesen. Es wird vermutet, dass der Verdauungstrakt des Geflügels, dessen normale Körpertemperatur zwischen 40,5 und 43 °C liegt, kein optimaler Lebensraum für die nicht-thermophilen *Arcobacter* bietet, weshalb diese Mikroorganismen den Darm passieren, aber ihn nicht besiedeln. (EIFERT et al., 2003)

### 2.5.3 Vorkommen in der Umgebung

Neben den Tieren selbst kann auch die Umgebung der Nutztierställe mit *Arcobacter* kontaminiert sein. Sowohl von Stiefeln der Mitarbeiter als auch von Wasserstellen auf Rinder- und Schweinefarmen konnten VAN DRIESSCHE et al. (2004, 2005) *Arcobacter* isolieren. Das experimentelle Infizieren von Hühnern mit *A. butzleri* zeigte bei Inokulation mit  $10^6$  und  $10^9$  CFU/Vogel eine Keimbelastung der Einstreu von mehr als 90 % sowie zu 100 % bei den Federproben. Selbst nach dem Töten der Tiere konnte *A. butzleri* noch Wochen später auf den untersuchten Oberflächen des Stalles nachgewiesen werden. (EIFERT et al., 2003)

Da *Arcobacter* mit relativ hohen Isolierungsraten in Hühnerfleisch vorkommt, im intestinalen Inhalt jedoch seltener nachzuweisen war, wurde angenommen, dass die Kontaminationsquellen in den Verarbeitungslinien zu finden sind (ATABAY und CORRY, 1997). In einer großflächigen Studie von HOUF et al. (2002b) an acht belgischen Hühnerschlachthöfen (Masthähnchen) erwiesen sich fast alle der untersuchten Schlachtkörper (ca. 95 %) als *Arcobacter*-positiv. Die Geräte und Anlagen dieser Betriebe zeigten bereits vor Schlachtbeginn eine Kontamination mit *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*. Auch wurde in den Transportkisten, aus denen sowohl nach Abladen der Tiere als auch nach der Reinigung Proben gezogen wurden, *A. cryaerophilus* nachgewiesen. Da aber die Geflügelhautproben vor dem Ausweiden und Zerkleinern der Tiere einen Keimgehalt von hundert bis mehreren tausend *Arcobacter* pro Gramm aufwiesen, schien es unwahrscheinlich, dass allein die Benutzung von Gerätschaften - auch wenn sie kontaminiert waren - diesen hohen Keimgehalt hervorrief. In einer weiteren Studie wollten die Autoren den möglichen Kontaminationsweg innerhalb der Hühnerschlachtung erfassen. Dazu prüften sie über einen Zeitraum von einer Woche die Schlachtlinie in einem belgischen Hühnerschlachtbetrieb (Masthähnchen). Die Proben wurden täglich von Gerätschaft und Ausrüstung sowie dem Betriebswasser vor dem Schlachtprozess und von den ersten geschlachteten Tieren genommen. Fast alle der 140 getesteten Nackenhautproben zeigten

sowohl vor als auch nach dem Ausweiden und Zerkleinern eine vergleichbare Kontaminationsrate mit *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*, die zwischen  $10^1$  und  $10^4$  CFU/g lag. Die Tupferproben der Geräte und Ausrüstung ergaben bei 83 der 124 untersuchten Proben einen *Arcobacter*-positiven Befund. Die negativen Proben konnten mit keinem speziellen Arbeitsbereich in Verbindung gebracht werden. Zu Beginn der Schlachtperiode zeigten sich weniger Geräte und Flächen (14 von 31) mit *Arcobacter* kontaminiert als an deren Ende (27 von 31). Von den insgesamt 1079 Isolaten konnten 159 *A. butzleri*- und 139 *A. cryaerophilus*-Stämme differenziert werden. Nur sechs bzw. neun der aus den Schlachtkörpern isolierten *A. butzleri*- bzw. *A. cryaerophilus*-Stämme wurden an den untersuchten Geräten und Arbeitsbereichen detektiert. Die Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass es keinen Zusammenhang zwischen den Umwelt- bzw. Schlachtkörperisolaten und dem Übertragungsweg gibt. (HOUF et al., 2003)

#### 2.5.4 Vorkommen in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Die bisherigen Studien zeigen, dass es sich bei *Arcobacter* um einen Keim handelt, der in Lebensmitteln tierischen Ursprungs weit verbreitet ist. Er findet sich vor allem in Hühnerfleisch, kommt aber auch in Schweine-, Rind- und Lammfleisch vor. In Japan erwiesen sich 23 % der Hühnerfleischproben, 7 % der Schweinefleischproben und 2,2 % der Rindfleischproben aus dem Einzelhandel als *A. butzleri*-, *A. cryaerophilus*- und *A. skirrowii*-positiv (KABEYA et al., 2004). Höhere Kontaminationsraten wurden in einer australischen Erhebung beobachtet: Dort zeigten sich 73 % der Hühner-, 29 % der Schweine-, 22 % der Rind- sowie 15 % der Lammfleischproben *Arcobacter*-positiv (RIVAS et al., 2004). Weitere Ergebnisse von Prävalenzstudien enthält die Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3.: Vorkommen von *Arcobacter* in Rohfleisch aus dem Einzelhandel

Land	Probenart	Probenanzahl	<i>Arcobacter</i> -positive Proben %	Methode		Literaturquelle
				Anreicherung	Festmedium	
Niederlande	Huhn	220	24,1	ASB	ASM	DE BOER et al., 1996
Italien	Huhn	32	0,0	PB	CCDA	ZANETTI et al., 1996
USA	Huhn	50	84,0	JM	JM	JOHNSON und MURANO, 1999b
Belgien	Huhn	51	76,5	AB mit CAT	/	HOUF et al., 2000
Belgien	Huhn	157	84,1	H	H	HOUF et al., 2001b
Spanien	Huhn	96	53,0	AB mit CAT	mCIN	GONZÁLEZ et al., 2000
Mexico	Huhn	45	40,0	JM	JM	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003

Land	Probenart	Probenanzahl	Arco-bacter-positive Proben %	Methode		Literaturquelle
				Anreicherung	Festmedium	
Irland	Huhn	50	50,0	JM	JM	SCULLION et al., 2004
Irland	Huhn	50	68,0	H	H	SCULLION et al., 2004
Irland	Huhn	50	68,0	mJM	JM	SCULLION et al., 2004
Japan	Huhn	41	48,0	ASB	ASM u. CIN	MORITA et al., 2004
Japan	Huhn	100	23,0	ASB	SA u. CIN	KABEYA et al., 2004
Thailand	Huhn	10	100,0	ASB	ASM u. CIN	MORITA et al., 2004
Australien	Huhn	22	73,0	AB mit CAT	AA o. BA	RIVAS et al., 2004
Türkei	Huhn	50	40,0	AB mit CAT	BA	OK ANADUT u. GÜMÜŞSOY, 2005
Irland	Huhn	94	62,0	mJM	JM	SCULLION et al., 2006
Schweiz	Huhn	238	15,1	AB mit CAT	/	KELLER et al., 2006
Türkei	Huhn	100	68,0	AB mit CAT	BA	AYDIN et al., 2007
Deutschland	Huhn	103	37,0	JM	JM	ROHDER et al., 2007
Italien	Pute	30	0,0	PB	CCDA	ZANETTI et al., 1996
USA	Pute	395	77,0	EMJH P-80	BHI-BA	MANKE et al., 1998
Dänemark	Pute	44	95,0	AB mit CAT	/	ATABAY et al., 2003
Türkei	Pute	50	4,0	AB mit CAT	BA	OK ANADUT u. GÜMÜŞSOY, 2005
Türkei	Pute	100	4,0	AB mit CAT	BA	AYDIN et al., 2007
Türkei	Wachtel	50	8,0	AB mit CAT	BA	OK ANADUT u. GÜMÜŞSOY, 2005
Niederlande	Schwein	194	0,5	ASB	ASM	DE BOER et al., 1996
Italien	Schwein	27	3,7	PB	CCDA	ZANETTI et al., 1996
USA	Schwein	200	32,0	JM	JM	OHLENDORF und MURANO, 2002a
Mexico	Schwein	45	51,1	JM	JM	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003
Japan	Schwein	100	7,0	ASB	SA u. CIN	KABEYA et al., 2004
Australien	Schwein	21	29,0	AB mit CAT	AA o. BA	RIVAS et al., 2004
Irland	Schwein	101	35,0	mJM	JM	SCULLION et al., 2006
Schweiz	Schwein	52	0,0	AB mit CAT	/	KELLER et al., 2006
Niederlande	Rind	68	1,5	ASB	ASM	DE BOER et al., 1996
Mexico	Rind	13	28,9	JM	JM	VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003
Japan	Rind	90	2,2	ASB	SA u. CIN	KABEYA et al., 2004
Australien	Rind	32	22,0	AB mit CAT	AA o. BA	RIVAS et al., 2004
Irland	Rind	108	34,0	mJM	JM	SCULLION et al., 2006
Schweiz	Rind	150	0,0	AB mit CAT	/	KELLER et al., 2006
Türkei	Rind	27	37,0	AB mit CAT	BA	AYDIN et al., 2007
Deutschland	Rind	75	4,0	JM	JM	ROHDER et al., 2007
Australien	Lamm	13	15,0	AB mit CAT	AA o. BA	RIVAS et al., 2004

AA = *Arcobacter*-Agar mit CAT (Cefoperazon-Amphotericin-Teicoplanin); AB mit CAT = *Arcobacter*-Bouillon mit Cefoperazon-Amphotericin-Teicoplanin (Oxoid, ATABAY und CORRY, 1998); ASB = *Arcobacter*-Selektiv-Bouillon (DE BOER et al., 1996) ASM = *Arcobacter*-Selektiv-Medium (DE BOER et al., 1996); BA = Blutagar; BHI-BA = Brain-Heart-Infusion-Blut-Agar (10 %); CCDA = Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar; CIN = Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar; H = Rezeptur nach HOUF et al. (2001b); JM = JOHNSON und MURANO (1999a, b); mCIN = modifizierter CIN-Agar - Zusatz von CAT (COLLINS et al., 1996a); mJM = JOHNSON und MURANO modifiziert (SCULLION et al., 2004); PB = PRESTON-Bouillon; SA = SKIRROW-Agar mit 5 % defibriniertes Pferdeblut; / = kein Selektivmedium verwendet, Direktnachweis mittels PCR

Am häufigsten wurde *A. butzleri* nachgewiesen, gefolgt von *A. cryaerophilus*. *A. skirrowii* konnte bisher seltener isoliert werden. Dabei ist unklar, ob das Fleisch an sich gering bzw.

nicht mit dieser Art belastet ist oder ob sie sich schwieriger anzüchten lässt. (DE BOER et al., 1996; HOUF et al., 2003; RIVAS et al., 2004; KABEYA et al., 2004; ÖNGÖR et al., 2004; MORITA et al., 2004)

Beachtung verdient auch, dass Hühnerfleisch vom Schlachthof gleich hoch mit *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* belastet ist wie Hühnerfleisch aus dem Einzelhandel (HOUF et al., 2002b; ATABAY et al., 2003; KABEYA et al., 2004).

### **2.5.5 Vorkommen in Wasser**

Neben Fleisch und Fleischerzeugnissen wurde *Arcobacter spp.*, hauptsächlich *A. butzleri*, auch in Trinkwasser, Oberflächenwasser, Grundwasser und in Abwasser bzw. Klärschlamm nachgewiesen (JACOB et al., 1993, 1998; RICE et al., 1999; STAMPI et al., 1999; MORENO et al., 2003, 2004; DIERGAARDT et al., 2004; MORITA et al., 2004). In einer Untersuchung deutscher Trinkwasserbehandlungsanlagen konnten zwar nur sechs *Campylobacter jejuni*- und *Campylobacter coli*-Stämme, aber 141 *Arcobacter*-Stämme, davon 100 *A. butzleri*-Stämme, isoliert werden (JACOB et al., 1998). Die unterschiedlichen Nachweisraten liegen möglicherweise in den bevorzugten Wachstumstemperaturen der Bakterien begründet.

Die Frage, ob Reinigungs- und Desinfektionsverfahren für Wasser zu einer Senkung des Keimgehaltes von *Arcobacter spp.* führen, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass diese Keime in einem ähnlichen Umfang wie andere Bakterien abgetötet werden. 1999 fanden RICE et al. heraus, dass Chlor hemmend auf diese Mikroorganismen wirkt. In einer Testreihe zur Tenazität von *Arcobacter spp.* in Brunnenwasser (5 °C) konnten sie zeigen, dass die Anzahl von *A. butzleri* bis zum 16. Tag um weniger als 0,5 log<sub>10</sub> CFU/ml sank. In einer weiteren Studie prüften sie in Brunnenwasser (5 °C) die Empfindlichkeit von drei *Arcobacter*-Stämmen (zwei Isolate und eine Positivkontrolle) gegenüber Chlorid. Durch dessen Zugabe (0,46 mg/l freies Chlor; 0,61 mg/l Gesamtchlor; pH 7,06) kam es innerhalb von einer Minute zu einer Abnahme der *Arcobacter*-Belastung um durchschnittlich 5,06 log<sub>10</sub> CFU/ml. In einem 35-tägigen Experiment zum Einfluss von Chlor auf das Überleben und die Vermehrung von *Arcobacter* in Trinkwasser (MORENO et al., 2004) zeigte sich der Keim durchaus überlebensfähig und blieb zunächst auf einem konstanten Niveau, aber nach 16 Tagen ließ sich keine Zelle mehr kultivieren.

Kontaminiertes Wasser bildet eine wichtige Infektionsquelle, entweder durch direkte Aufnahme oder aber als Transportmedium. Die Fähigkeit von *A. butzleri*, sich leicht an der Oberfläche der Trinkwasserleitungen in Form eines Biofilms anzuheften (rostfreier Stahl, Kupfer und Plastik), ermöglicht ein Bewachsen der Wasserverteilungssysteme und kann für das öffentliche Gesundheitswesen zu einem signifikanten Problem in Trinkwasser- und Lebensmittelverarbeitungsbetrieben werden (ASSANTA et al., 2002).

### **2.5.6 Vorkommen in anderen Lebensmitteln**

Über den Nachweis von *Arcobacter spp.* in Lebensmitteln außer Fleisch und Trinkwasser liegen kaum Berichte vor. Lediglich in Muscheln und Austern (MAUGERI et al., 2000; ROMERO et al., 2002 - über Nachweishäufigkeit keine Angaben) sowie in den von SCULLION et al. (2006) analysierten Rohmilchproben (n = 101, 46 %) wurde *Arcobacter* gefunden.

### **2.5.7 Kritische Überlegungen bei der Evaluierung derzeitiger Nachweisdaten**

Die bisherigen Angaben über die *Arcobacter*-Prävalenz bei Mensch, Tier und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs variieren teilweise. Diese Diskrepanzen könnten u. a. in der unterschiedlichen Gestaltung der Experimente, der verschiedenen Probengrößen und der verwendeten Identifizierungs-/Isolierungsmethoden begründet liegen. So wurde zum Beispiel über Selektivanreicherung eine höhere Anzahl von *Arcobacter spp.* isoliert als über Direktisolierung. In einer Studie von VAN DRIESSCHE et al. (2003) waren beim Direktnachweis nur 10 % der Rinderkotproben *Arcobacter*-positiv, wohingegen über Anreicherung 39 % positive Proben ermittelt wurden. Ähnliche Unterschiede in den Raten ließen sich bei den Fäkalproben von Schweinen (28 % im Vergleich zu 44 %), von Schafen (5 % im Vergleich zu 16 %) und von Pferden (0 % im Vergleich zu 15 %) nachweisen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass auch in Abhängigkeit von Direktisolierung oder Anreicherungsverfahren der Nachweis der Spezies bzw. Genotypen variieren kann. In Schweine- und Rinderkotproben ließen sich über Direktisolierung neben *A. butzleri* auch *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* anzüchten, mittels Anreicherungsverfahrens wurde aber nur *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* isoliert. Eine eventuelle Konkurrenz unter den Spezies könnte diese Befunde erklären (VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2004, 2005). Tabelle 2.4. gibt einen Überblick über die 2004 publizierten Befunde dieser Autoren.

Tabelle 2.4.: *Arcobacter*-Verteilung nach Direktisolation und nach Anreicherung

Farm (Proben)	Isolations- methode	<i>Arcobacter</i> - positive Proben Anzahl (%)	Anzahl der positiven Proben für						
			Ab	Ac	As	Ab + Ac	Ab + As	Ac + As	Ab + Ac + As
A (98)	Direktisolation	6 (6)	0	4	1	0	0	1	0
	Anreicherung	16 (16)	0	16	0	0	0	0	0
B (118)	Direktisolation	20 (17)	10	2	1	3	1	3	0
	Anreicherung	49 (42)	39	5	4	1	0	0	0
C (39)	Direktisolation	9 (23)	5	1	1	0	0	1	1
	Anreicherung	23 (59)	21	2	0	0	0	0	0
D (39)	Direktisolation	20 (51)	16	0	0	4	0	0	0
	Anreicherung	33 (85)	32	1	0	0	0	0	0

Ab = *Arcobacter butzleri*, Ac = *Arcobacter cryaerophilus*, As = *Arcobacter skirrowii*

Quelle: VAN DRIESSCHE et al. (2004)

Auch bei parallelem Einsatz von konventionellen mikrobiologischen Kultivierungsverfahren und genotypischen Isolierungsmethoden ergaben sich Differenzen in der Verteilung von *Arcobacter spp.* FERA et al. (2004) konnten aus Seewasser- und Planktonproben mittels PCR zu 77,8 % *A. butzleri*, 55,5 % *A. cryaerophilus* und 8,3 % *A. skirrowii* detektieren. Hingegen war über die verwendete klassische Nachweismethode (*Arcobacter*-Bouillon und Agar mit CAT und CCDA; Oxoid: CM 965, SR 174 E, SR 155) lediglich *A. butzleri* nachweisbar und auch nur mit einer Häufigkeit von 41,7 %. Die Schwierigkeit bei der Isolierung von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* hängt wahrscheinlich mit ihrer Sensitivität gegenüber den in Selektivmedien verwendeten Antibiotika und sonstigen Rezepturbestandteilen zusammen (ATABAY et al., 1998; HOUF et al., 2001a; KABEYA et al., 2003b, 2004). Auch zeigten sich *A. skirrowii*-Kolonien aus Tierfäkalien oft erst nach dreitägiger bzw. in einer Humanstudie sogar erst nach viertägiger Inkubation (VAN DRIESSCHE et al., 2003; WYBO et al., 2004). Bei dem im Routineverfahren üblichen ein- bis zweitägigem Inkubieren der Anreicherung können die spärlich wachsenden *A. skirrowii* von anderen Bakterien überwuchert werden. Um sonstige enterische Keime zu entfernen, wurde die Membranfiltermethode vorgeschlagen, wodurch jedoch zusätzliche Diagnosekosten entstehen (ATABAY und CORRY, 1997; ÖNGÖR et al., 2004).

Für einen einfacheren, besseren und gleichzeitigen Nachweis mehrerer *Arcobacter*-Stämme kommt die multiplex PCR-Analytik zum Einsatz (WINTERS und SLAVIK, 2000; RIVAS et al., 2004), von der unterschiedliche Varianten entwickelt wurden (HARMON und WESLEY,

1997; HOUF et al., 2000; KABEYA et al., 2003a). Mit Entdeckung der neuen Spezies *A. cibarius* (HOUF et al., 2005) zeigte sich aber, dass die bisherigen Verfahren nur auf das Erkennen der rDNA von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* begrenzt waren. HO et al. (2006a) stellten fest, dass ein simultaner Nachweis von mehreren *Arcobacter*-Spezies dann gelingt, wenn etwa die gleiche Menge an Matrixgemisch vorliegt. Ebenso ist der Nachweis über mPCR an hohe Keimzahlen gebunden, sodass die Möglichkeit systematischer Fehler in Betracht gezogen werden sollte.

Neben methodisch bedingten Effekten auf die Nachweisraten werden auch geografische Faktoren, die Fleischverarbeitungsprozesse und der Fettgehalt des Fleisches sowie das Alter und die Zuchtlinien der Tiere als Ursache in Betracht gezogen. So sammelten OHLENDORF und MURANO (2002a) Schweinefleischproben über ein geografisch weiträumiges Gebiet innerhalb der USA, einschließlich Pennsylvania, Georgia, Iowa und North Carolina. Die Auswertung der erhobenen Daten ergab, dass die Kontaminationsraten der einzelnen Schlachtbetriebe zwischen 0 und 68 % variierten. Zusätzlich war zu beobachten, dass fettarmes Schweinehackfleisch (Fettgehalt: 7 bis 39 %) mit einer Prävalenz von 20 % stärker mit *Arcobacter* belastet war als das Schweinegehackte mit höherem Fettgehalt (40 bis 79 %), bei dem die Isolierungsrate 4 % betrug. Allerdings zeigte sich bei der Laborarbeit, dass sich fettarmes Schweinefleisch besser homogenisieren ließ. Ob eine methodisch bedingte Lücke in der Sensibilität (JOHNSON-MURANO-Methode) oder der hohe Fettgehalt das geringe Vorkommen begründet, ist anhand weiterer Studien zu untersuchen.

Einige Erhebungen lassen vermuten, dass sich auch das Alter der Tiere auf die Nachweishäufigkeit auswirkt. WESLEY und BAETZ (1999) ermittelten die niedrigste Kontaminationsrate bei 8 und 16 Wochen alten Hühnern (1 und 3 %), während sie die höchste Nachweisrate (57 %) bei 56 Wochen alten Zuchttieren beobachteten. Ebenso zeigten die von VAN DRIESSCHE et al. (2004) untersuchten Sauen eine stärkere Belastung mit *Arcobacter* als die getesteten Mastschweine. Eine mögliche Ursache für den Zusammenhang zwischen dem Alter der Schweine und dem Anstieg der Nachweisrate könnte der stetige Kontaminationsdruck aus der Umwelt sein (HUME et al., 2001). Jedoch konnte bei Untersuchungen an Rindern keine derart eindeutige Korrelation beobachtet werden. Es zeigten sich laut GOLLA et al. (2002) die Weide- und Milchkühe stärker mit *A. butzleri* belastet als die untersuchten Kälber. Unterschiedliche Umweltbelastung und/oder

die verschiedenen Futterbestandteile können möglicherweise die Ergebnisse begründen, nämlich energiereiches Futter für Weide- und Milchkühe gegenüber Kälberfutter auf Gras- und Milchbasis. Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von VAN DRIESSCHE et al. (2005), bei denen die höchste *Arcobacter*-Anzahl bei Kälbern nachgewiesen wurde, gefolgt von den Jungkühen sowie den Milchkühen mit der niedrigsten Rate. Die Autoren erklärten diese Daten damit, dass in der ersten Studie die Tiere von derselben Farm stammten und in der zweiten Studie das Untersuchungsmaterial von verschiedenen Viehbetrieben gezogen wurde.

Des Weiteren kann das jeweilige Betriebsmanagement als ein wichtiger Effektor für die unterschiedlichen Nachweisraten in den verschiedenen Viehbeständen angesehen werden. Dabei bilden Herdengröße (WESLEY et al., 2000), Hygiene, Wasserversorgung und Fütterung (WESLEY et al., 2000; GOLLA et al., 2002; VAN DRIESSCHE et al., 2005) relevante Parameter. Durch die Fähigkeit, bei niedrigen Temperaturen und unter aeroben Bedingungen zu wachsen, ist *Arcobacter* für das Überleben und die Kontamination von Wasserquellen besser geeignet als andere Keime, wie zum Beispiel *Campylobacter*. Prophylaktisch kann die Wasseraufnahme über Selbsttränken (Tränkebecken mit Druckventil) das Ausbreiten von *Arcobacter spp.* über kontaminiertes Wasser reduzieren (WESLEY et al., 2000). Auch das Beseitigen des Stallmistes durch Spülen der Stallgassen begünstigt einen Keimanstieg. Was andere enterische Bakterien als Nahrung und Nahrungsergänzungen verwenden, kann zudem aufgrund der veränderten Homöostase im Verdauungstrakt auf das Wachstum von *Arcobacter* Einfluss nehmen. Einen abwehrenden Effekt gegen *Arcobacter*-Infektionen erbrachte die Fütterung von Luzerne an Milchkühe (WESLEY et al., 2000). Die Beigabe von Baumwollsamensamen und -hüllen hingegen zeigte keine Wirkung.

Ebenso wird diskutiert, ob eventuell saisonale Faktoren Einfluss auf das Vorkommen von *Arcobacter spp.* nehmen. VAN DRIESSCHE et al. (2004) untersuchten Schweinefäkalien und ermittelten im Frühjahr höhere Raten als in den Sommermonaten. Die gleichen Ergebnisse lieferten die von MANKE et al. (1998) und STAMPI et al. (1999) untersuchten Putenfleisch- und Wasserproben. Andererseits waren in japanischen Studien keine quantitativen Unterschiede zwischen Sommer und Winter festzustellen (KABEYA et al., 2003b). Gleiches gilt für eine niederländische Erhebung, denn hier erwiesen sich Sauen im Juni und Dezember als gleich stark keimbelastet (HO et al., 2006a).

## 2.6 Tenazität von *Arcobacter spp.*

Der Begriff Tenazität (Lateinisch: tenacitas = Zähigkeit) beschreibt die Überlebensfähigkeit und Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen, Viren u. a. gegenüber bestimmten äußeren chemischen und physikalischen Einflüssen, wie zum Beispiel Temperatur, Trockenheit etc. (SPROCKHOFF, 1979).

### 2.6.1 Temperaturtoleranz

Generell tolerieren *Arcobacter spp.* ein breites Temperaturspektrum. Nach HILTON et al. (2001) erwies sich der *A. butzleri*-Stamm NCTC 12481 bei Temperaturen von 15 bis 37 °C vermehrungsfähig und besaß eine maximale spezifische Wachstumsrate von 0,57/h bei 30 °C und pH 7. Wachstum und Vermehrung bei Temperaturen unter 15 °C und über 40 °C konnte nicht beobachtet werden. Obwohl diese Ergebnisse frühere Studien von VANDAMME et al. (1992a) bestätigten, stellten YAN et al. (2000) sowie D'SA und HARRISON (2005) für *A. butzleri*-Stämme auch ein leichtes Wachstum bei 42 °C fest. Zudem vermehrten sich diese Stämme auch bei 10 °C.

HILTON et al. (2001) beobachteten, dass während einer 21-tägigen Lagerung bei 4 °C die Lebensfähigkeit von *A. butzleri* graduell abnahm, und zwar von  $1 \times 10^9$  auf  $8 \times 10^5$  CFU/ml. Im Gegensatz dazu verursachte das Tiefgefrieren bei -20 °C nach nur 24 Stunden Lagerung eine Zellzahlverringerng von 2 log. Danach blieb die Keimdichte konstant bei  $0,6 - 1 \times 10^5$  CFU/ml. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass *A. butzleri* generell Temperaturen im Kühlbereich besser übersteht als diejenigen im Gefrierbereich. Vergleichsuntersuchungen über das Vorkommen von *Arcobacter spp.* in gekühltem sowie tiefgekühltem Fleisch liegen noch nicht vor. Allerdings führten ATABAY et al. (2003) Erhebungen über die Prävalenz von *Arcobacter* in frischem und gefrorenem sowie frischem und gekühltem Hühnerfleisch durch. Dabei ermittelten sie in frischem Fleisch eine *A. butzleri*-Häufigkeit von 95 % und in gefrorenem Fleisch von nur 23 %.

Bei Erhebungen an Geflügelschlachthöfen über den Einfluss der Brühwassertemperatur (Hochbrühen: Wassertemperatur von 55 °C bis 60 °C für 60 bis 90 Sekunden; Niedrigbrühen: Wassertemperatur von 48 °C bis 53 °C für 120 bis 180 Sekunden; Für Broiler hat sich das Hochbrühen bewährt.) und der Kühlungstemperatur (Temperatur der Karkassen

wird innerhalb einer Stunde von ca. 40 °C auf maximal 4 °C gesenkt; Tauchkühlung: erste Kühltemperatur ca. 10 °C, Hauptkühlung 2 °C) auf die Reduzierung der *Arcobacter*-Anzahl zeigten sich bei der Prävalenz auf den Oberflächen der Karkassen signifikante Unterschiede. Die höchste Kontaminationsrate wurde nach dem Brühen mit 96,8 % ermittelt, gefolgt von der Vorkühlung mit 61,3 %. Die intensivste Keim reduzierende Wirkung zeigte das Nachkühlen mit nur noch 9,6 % positiven Proben. (SON et al., 2006)

### 2.6.2 Hitzebeständigkeit

Ein Maß für die Hitzbeständigkeit von Mikroorganismen gegenüber unterschiedlichen Temperaturen bilden der z- und der D-Wert. Die dezimale Reduktionszeit, der D-Wert, ist definiert als die Zeit in Minuten, die erforderlich ist, um unter genau festgelegten Bedingungen, zum Beispiel bei einer bestimmten Temperatur, die Ausgangskeimzahl um den Faktor 10, das heißt um 90 %, zu reduzieren. Der z-Wert gibt an, um wie viel Grad die Temperatur erhöht werden muss, um den D-Wert um 90 % zu senken. Mit Hilfe des z- und des D-Wertes lässt sich das Absterbeverhalten der Mikroorganismen bei anderen Temperaturen als den gemessenen berechnen.

HILTON et al. (2001) ermittelten für *A. butzleri* D-Werte von 1,9 - 0,75 min bei 50 °C und 55 °C sowie z-Werte von 7,8 °C. D'SA und HARRISON (2005) untersuchten sechs humanpathogene Isolate, und zwar vier *A. butzleri*- und zwei *A. cryaerophilus*-Stämme. Sie ermittelten bei drei der in phosphatgepufferter Kochsalzlösung getesteten *Arcobacter*-Stämme bei pH-Wert 7,3 D-Werte von 0,07 - 0,12 min bei 60 °C, 0,38 - 0,76 min bei 55 °C und 5,12 - 5,81 min bei 50 °C. Bei einem pH-Wert von 5,5 zeigten die Keime eine verringerte Thermotoleranz mit D-Werten von 0,03 - 0,11 min bei 60 °C, 0,3 - 0,42 min bei 55 °C und 1,97 - 4,42 min bei 50 °C. Der ermittelte z-Wert lag zwischen 5,2 bis 6,28 °C. Die D-Werte eines *Arcobacter*-Gemisches aus drei Stämmen, die aus rohem Schweinegehackten isoliert worden waren, lauteten 18,51 min bei 50 °C und 2,18 min bei 55 °C. Gegenüber leichtem Erhitzen (30 sec bzw. 1 min bei 50 °C) und anschließendem Abkühlen mit Eiswasser bei 4 und 8 °C zeigten sich die Keime empfindlich. Das Kälteschockverfahren führte im Gegensatz zu der Behandlung mit Kaltwasser (12 oder 16 °C) bzw. ohne Wasser zu einer stärkeren Keimzahlreduzierung.

### 2.6.3 pH-Wert

Neben der Temperatur ist die Wasserstoffionenkonzentration (pH-Wert) des Mediums der wichtigste physikalische Faktor, der den Stoffwechsel und das Wachstum der Mikroorganismen beeinflusst. Bei *Campylobacter* liegen die pH-Wert-Bereiche für das Wachstum zwischen 4,9 und ungefähr 9 mit einem Optimum bei pH 6,5 bis 7,5 (PARK, 2005). HILTON et al. (2001) beobachteten bei *A. butzleri* eine Vermehrung in einem pH-Wert-Bereich von 5 bis 8,5 bei 30 °C. Das Optimum lag zwischen pH 6 und 8. Ähnliche Werte ergaben die Studien von D'SA und HARRISON (2005): Für die überwiegende Zahl der getesteten *Arcobacter*-Stämme wurde ein Wachstum bei pH-Werten von 5,5 bis 8 beobachtet. Das Optimum von *A. butzleri* lag in einem Intervall von pH 6 bis 7 und von *A. cryaerophilus* in einem pH-Wert-Bereich von 7 bis 7,5.

*Arcobacter* zeigt sich nicht überlebensfähig bei einem pH-Wert von < 4, aber die hemmende pH-Wert-Schwelle ist abhängig von der Art der Säure, den sonstigen Wachstumsbedingungen und der Wachstumsphase (PHILLIPS und BATES, 2004).

### 2.6.4 Wasseraktivität

Die Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert), die ein Maß für das frei verfügbare Wasser darstellt, ist für das Wachstum von Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung. Der  $a_w$ -Wert berechnet sich aus dem Quotienten des Wasserdampfdrucks über dem Lebensmittel ( $p$ ) und dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser ( $p_0$ ) bei einer bestimmten Temperatur ( $a_w$ -Wert =  $p/p_0$ ) und wird in einer Zahl von 0 bis 1 ausgedrückt. Reines Wasser besitzt einen  $a_w$ -Wert von 1, während absolut wasserfreie Stoffe einen  $a_w$ -Wert von 0 haben. Die Wasserverfügbarkeit der meisten frischen Lebensmittel liegt zwischen 0,98 und 0,99, was gleichzeitig den optimalen Wert für das Wachstum vieler Mikroorganismen bildet. Bakterien stellen meist sehr hohe Ansprüche an den Gehalt frei verfügbaren Wassers in Lebensmitteln. Alle potentiell pathogenen Keime reagieren sehr empfindlich bei einer niedrigen Wasseraktivität und benötigen zur Vermehrung zumindest einen  $a_w$ -Wert zwischen 0,91 und 0,96 (Wachstumsoptimum oberhalb  $a_w = 0,98$ ).

Der  $a_w$ -Wert wird maßgeblich von gelösten Stoffen und deren Ionen beeinflusst, wobei die Kochsalzkonzentration eine wesentliche Rolle spielt. Von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* wird eine NaCl-Konzentration von 2 % ( $a_w$ -Bereich 0,984 - 0,987) gut toleriert.

Sehr empfindlich gegenüber höheren Salzkonzentrationen erweist sich *A. cryaerophilus*: In Medien mit bis zu 4 % NaCl ( $a_w$ -Bereich 0.972 - 0.975) ist die Kultivierung von einigen *A. butzleri*- und *A. skirrowii*-Stämmen durchaus möglich, auf *A. cryaerophilus* wirken NaCl-Konzentrationen von 3,5 bzw. 4 % bakterizid (ATABAY et al., 1998). In neueren Studien wurde jedoch für *A. butzleri* eine höhere Sensibilität gegenüber einer 4 %igen Salzkonzentration festgestellt: Keines der 49 (0/49) getesteten Isolate konnte bei diesem NaCl-Gehalt kultiviert werden, während bei einer Salzkonzentration von 2 % ein 100 %iger (49/49) Nachweis vitaler Keime gegeben war (ATABAY et al., 2003).

Dass die  $a_w$ -Ansprüche innerhalb der Gattung *Arcobacter spp.* variieren, zeigten auch die Studien von D'SA und HARRISON (2005). Die optimale NaCl-Konzentration für *A. cryaerophilus* bewegte sich nach einer 24-stündigen Inkubation zwischen 0,5 und 1 % und nach 96 Stunden zwischen 0,5 und 2 %. Das Wachstumsoptimum der *A. butzleri*-Stämme lag nach 96-stündiger Inkubation zwischen 0,09 und 0,5 % NaCl. Der obere Grenzwert betrug für *A. butzleri* 3,5 % und für *A. cryaerophilus* 3 %. Bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C und einem Salzgehalt von bis zu 5 % überlebten zwei *A. butzleri*-Stämme und ein *A. cryaerophilus*-Stamm.

In Studien von ČERVENKA et al. (2003) an *A. butzleri*- und *A. cryaerophilus*-Stämmen zeigten sich alle Keime extrem empfindlich gegenüber  $a_w$ -Werten von  $< 0.980$ . Zur  $a_w$ -Wert-Einstellung dienten NaCl, Saccharose und Glycerin.

Tabelle 2.5. fasst die Wirkungen von  $a_w$ -Wert und Kochsalzkonzentration auf das Wachstum von *Arcobacter spp.* noch einmal zusammen.

Tabelle 2.5.: Sensibilität von *Arcobacter spp.* gegenüber NaCl und  $a_w$ -Werten

NaCl (%)	$a_w$ -Wert-Bereich*	% positive Isolate (Anzahl getesteter Isolate)			Literaturquelle
		<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>	
2,0	0.984 - 0.987	100 (34)	93 (14)	100 (2)	ATABAY et al., 1998
		92 (12)	84 (19)	99 (9)	ON et al., 1996
3,5	0.975 - 0.978	70 (34)	0 (14)	100 (2)	ATABAY et al., 1998
		67 (12)	1 (19)	99 (9)	ON et al., 1996
		57 (14)	n. b.	n. b.	MAUGERI et al., 2000
		42 (12)	3,9 (51)	61 (18)	VANDAMME et al., 1992a
		84 (89)	n. b.	n. b.	HARRASS et al., 1998
4,0	0.972 - 0.975	15 (34)	0 (14)	100 (2)	ATABAY et al., 1998
		1 (12)	1 (19)	99 (9)	ON et al., 1996

\*bestimmt nach RESNIK und CHIRIFE (1988)

n. b. = nicht bestimmt

Quelle:

Survival and inactivation of *Arcobacter spp.*, a current status and future prospect, L. ČERVENKA, Critical Reviews in Microbiology (2007)

### 2.6.5 Desinfektionsmittel und organische Säuren

Essig- und Zitronensäure mit einer Konzentration von  $\geq 0,2$  % wirken auf *A. butzleri* nach vierstündiger Inkubation bei 30 °C bakterizid. Bei einer reduzierten Wasseraktivität ( $a_w = 0.977$ ) in Verbindung mit Essigsäure konnte allerdings eine längere Überlebensdauer beobachtet werden. Dagegen führte Zitronensäure - ebenfalls in Verbindung mit einer verringerten Wasseraktivität - zu einer schnelleren Inaktivierung der Erreger als in Verbindung mit einer hohen Wasseraktivität ( $a_w = 0.993$ ). Bei Essig- und Zitronensäurekonzentrationen von 0,1 % zeigten sich die Keime noch nach achtstündiger Inkubation lebensfähig, wobei die Zellkonzentration signifikant geringer war als bei den Kontrollproben. Eine Keimzahlreduzierung brachte auch Trinatriumzitat in Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 1,5 % und einem eingestellten  $a_w$  von 0.993 (ČERVENKA et al., 2004). Entsprechendes konnte PHILLIPS (1999) in ihrer Studie an *A. butzleri*-Stämmen beobachten, wobei die keimreduzierende Wirkung von 0,5 %igem, 1 %igem und 1,5 %igem Natriumzitat überprüft wurde. Auch für Milchsäure in Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 2 % fand die Autorin diesen Effekt. Eine bakterizide Wirkung für Zitronensäure wies sie bei Konzentrationen von 0,5 - 2 % nach. Tests mit Natriumlaktat zeigten keine antibakterielle Wirkung gegen *Arcobacter*.

Untersuchungen zur Wirkung von Nisin ergaben, dass eine Konzentration von 500 IU/ml bei einer Inkubation für 2,5 bis 5 Stunden bei 30 °C das Wachstum von *A. butzleri* hemmte, aber nach 30-stündiger Bebrütung kein signifikanter Keimzahlunterschied im Vergleich zur Kontrollprobe mehr nachweisbar war. Nisin unterstützte den antibakteriellen Effekt von Natriumzitat nicht, jedoch verstärkte es (500 IU/ml) die Wirkung von 2 %igem Natriumlaktat (PHILLIPS, 1999). In einer weiteren In-situ-Studie erwies sich eine zehnmündige Behandlung mit 100 mM Zitronensäure bei 4 °C und anschließender Inkubation mit Nisin (500 IU/ml) in einem Wasserbad bei 30 °C als effektivste Methode für die vollständige Inaktivierung von *A. butzleri* (PHILLIPS und DUGGAN, 2002). Bei einer aktuellen In-vivo-Studie an Hühnerfleisch konnten LONG und PHILLIPS (2003) feststellen, dass die neuen Ergebnisse zur Wirkung von Nisin, Natriumlaktat und -zitat nicht mit den bisherigen In-situ-Studien übereinstimmten. *A. butzleri* zeigte sich bei 5 °C und 30 °C unempfindlich gegen 500 IU/ml Nisin, während bei 5 °C der Einsatz von 2 % Natriumlaktat, von 2 % Natriumlaktat und 500 IU/ml Nisin, von 1,5 % Natriumlaktat und von 1,5 % Natriumzitat sowie 2 % Natriumzitat und 500 IU/ml Nisin im Vergleich zu den Kontrollproben signifikante Keimzahlreduzierungen hervorrief ( $P < 0.05$ ). Vorbehandlung mit EDTA (20 mM) oder Natriumtriphosphat (10 %) bei Kühlungstemperaturen und anschließender Zugabe von Nisin (500 UI/ml) hemmte das Wachstum von *A. butzleri* über 24 Stunden nachhaltig. *Arcobacter spp.* scheint gegenüber 0,5 mM Natriumtriphosphat resistenter zu sein als *C. jejuni*. Nach Zugabe von 0,5 mM Natriumtriphosphat konnte bei *C. jejuni* eine 6-log-Zyklusreduktion und bei *A. butzleri* dagegen nur eine 0,1 - 1,1-log-Zyklusreduktion erreicht werden (CARNEIRO DE MELO et al., 1998; PHILLIPS und DUGGAN, 2001).

### 2.6.6 Bestrahlung

In Studien über den Einfluss der Bestrahlung (unter Vakuum in Schweinegehacktem) zeigte sich *A. butzleri* unempfindlicher als *Campylobacter*. Der  $D_{10}$ -Wert von *A. butzleri* ( $D_{10}$  0,27 kGy) war 1,4 x höher als der von *C. jejuni* (0,19 kGy). Die Bestrahlung mit 1,5 kGy führte zu einer Keimzahlreduzierung von 5-log-Einheiten für *A. butzleri* und von 7-log-Einheiten für *C. jejuni*. Eine solche Dosis wäre ausreichend, um diese Pathogene in Fleischprodukten unter Kontrolle zu bringen. (COLLINS et al., 1996b)

### 2.6.7 Verhalten gegenüber Metallen

In einer Studie von OTTH et al. (2005) zur Sensibilität gegenüber Schwermetallen waren alle 50 *A. butzleri*-Stämme, isoliert aus Hühnerlebern (12), aus Muscheln (18), aus Flusswasser (6), aus den Faezes von Rindern (5), Enten (2) und Pelikanen (7), gegen Molybdän, Mangan, Nickel, Cobalt, Blei und Eisen resistent und gegenüber Quecksilber, Silber und Chrom sensibel. Die ermittelten MIC-Werte zeigten aber eine hohe Variabilität, was auf ein nicht einheitliches Verhalten der Stämme hinweist.

### 2.6.8 Verhalten gegenüber Antibiotika

In allen bisherigen Studien konnte eine beachtenswerte Multiresistenz von *Arcobacter spp.* festgestellt werden. Eine geringe Empfindlichkeit besteht gegenüber Trimethoprim, Sulfamethoxazol-Trimethoprim und gegenüber Vertretern der Beta-Laktam-Antibiotika (Methicillin, Oxacillin) einschließlich der Cephalosporine (Cefalotin). Dabei zeigt sich *A. butzleri* resistenter als *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Ebenso sind die Keime immun gegen antimikrobielle Substanzen, wie zum Beispiel Aztreonam (Monobactam), die zur Behandlung multiresistenter, gramnegativer Bakterien eingesetzt werden (ATABAY und AYDIN, 2001; FERA et al., 2003; KABEYA et al., 2004).

Die meisten Stämme zeigen eine erhöhte Sensibilität gegen Erythromycin (Makrolid) und Ciprofloxacin (Chinolon), die gewöhnlich zur Behandlung von Infektionen mit *Campylobacter* und ähnlichen Bakterien dienen (HOUF et al., 2004). Eine sehr gute Wirkung gegen *Arcobacter spp.* entfalten ebenso Aminoglykoside (z. B. Amikacin, Tobramycin, Kanamycin, Streptomycin) und Tetracycline (ATABAY und AYDIN, 2001; FERA et al., 2003; KABEYA et al., 2004).

ABDELBAQI et al. (2005, 2007) konnten bei *Arcobacter gyrA*-Gene identifizieren. Die DNA-Gyrase (Topoisomerase), ein bakterielles Enzym aus zwei Untereinheiten, die durch die Gene *gyrA* und *gyrB* codiert werden, katalysiert die negative (rechtsdrehende) Superspiralisierung der DNA und beeinflusst die DNA-Reproduktion und RNA-Transkription. Einige Antibiotika, einschließlich Cumarine (z. B. Novobiocin) und Chinolone (z. B. Cipro-, Enro-, Levo-, Marbofloxacin), wirken antibakteriell durch Hemmung der DNA-Gyrase (MAXWELL, 1997). Mutationen der Gene, die DNA-Gyrase codieren, können zu einer Resistenz gegen diese Antibiotika führen (HOOPER, 1998). Solche Mutationen in der

Chinolon-Resistenz-determinierenden-Region (QRDR) wurden in zwei *A. butzleri*-Isolaten und einem *A. cryaerophilus*-Isolat gefunden, die sich gegenüber Ciprofloxacin resistent verhielten (ABDELBAQI et al., 2005, 2007). Ebenso ist hervorzuheben, dass *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* in den Untersuchungen von HOUF et al. (2001a) eine hohe Novobiocin-Resistenz zeigten.

In ihrer Studie untersuchten HOUF et al. (2001a) die Zweckmäßigkeit der gebräuchlichsten Antibiotika zur Isolierung von *Arcobacter* spp. Ein weiteres Ziel war, festzustellen, ob antimikrobielle Sensibilitätsmuster zur Differenzierung der drei tierassoziierten *Arcobacter*-Stämme benutzt werden könnten. Die ermittelten MICs der 12 getesteten Antibiotika ließen in den Mustern keine Unterschiede erkennen, obgleich die *A. skirrowii*-Isolate empfindlicher als die *A. butzleri*- und *A. cryaerophilus*-Isolate reagierten. Die 111 Isolate zeigten eine hohe Resistenz (MIC > 256 µg/ml) gegen die beiden antimykotischen Arzneistoffe Amphotericin B und Cycloheximid sowie gegen 5-Fluorouracil. Bei den meisten Stämmen konnte eine Resistenz gegen Novobiocin und eine variable Sensibilität gegen Piperacillin, Trimethoprim und Vancomycin beobachtet werden. Eine hohe Resistenz gegen Bacitracin (MIC > 256 U/ml) wurde bei zwei *A. cryaerophilus*-Stämmen (Untergruppe 2) festgestellt. Alle *Arcobacter*-Stämme verhielten sich sensibel gegenüber Rifampin und Colistin (Polymyxin B), zwei wichtige Hemmstoffe in *Campylobacter*-Selektivmedien. Von den beiden getesteten Cephalosporinen, nämlich Cefotaxim und Cefoperazon, erwies sich ersteres als aktiver gegen *Arcobacter*.

Die Ergebnisse erklären einige bei der Isolierung von *Arcobacter* gemachte Beobachtungen. Viele der *A. skirrowii*- und *A. cryaerophilus*-Stämme zeigten eine Sensibilität gegen Piperacillin bei einer Konzentration von 64 µg/ml, also bei einer Menge, die nur etwas niedriger liegt, als die von DE BOER et al. (1996) in ihrem Selektivmedium vorgegebene (75 µg/ml). HOUF et al. (2001a) vermuteten, dass darin eine Erklärung liegt, weshalb mit diesem Medium nur die Isolierung von *A. butzleri* gelingt. Ebenso könnte das Hinzufügen von Cefoperazon mit einer Konzentration von 32 µg/ml (DE BOER-Medium und JOHNSON-MURANO-Medium) die Zellen von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* verletzen und schädigen. Der MIC-Wert von Cefoperazon liegt nur knapp über der verwendeten Menge. Diese sowie die von KIEHLBAUCH et al. (1992) durchgeführte Sensibilitätsuntersuchung legen nahe, dass sich das CVA-Selektivmedium und das CIN-Selektivmedium (COLLINS et al., 1996a) zwar für die Isolierung von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* eignen, jedoch nicht für den

Nachweis von *A. skirrowii*. Weiterhin zeigen die ermittelten MICs sowie die Aktivität des Teicoplanins, die mit der des Vancomycins vergleichbar ist, dass die von ATABAY und CORRY (1998) verwendeten Antibiotika (CAT: Cefoperazon 8 µg/ml, Amphotericin B 10 µg/ml und Teicoplanin 4 µg/ml) durchaus für die Isolierung von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* dienlich sind, jedoch in der angegebenen Konzentration die konkurrierende Keimflora nicht ausreichend unterdrücken. Dieser Einwand trifft auch für die im EMJH-Medium verwendete 5-Fluorouracil-Konzentration zu.

5-Fluorouracil, Novobiocin, Cefoperazon, Trimethoprim und Teicoplanin oder Vancomycin wirken in der richtigen Konzentration nicht hemmend auf das Wachstum von *Arcobacter*, können aber als selektive Agenzien in *Arcobacter*-Isolierungsmedien gegen eventuell vorhandene Begleitflora eingesetzt werden.

Tabelle 2.6. fasst eine Vielzahl der zur Antibiotikaresistenz publizierten Daten zusammen.

Tabelle 2.6.: Resistenzverhalten von *Arcobacter spp.*

Antibiotikum	Zahl resistenter Stämme			Literaturquelle
	<i>A. butzleri</i> % resistent (n)	<i>A. cryaerophilus</i> % resistent (n)	<i>A. skirrowii</i> % resistent (n)	
Amikacin	0,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Amoxicillin	64,1 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Ampicillin	21,3 (61) 0,0 (96) 90,0 (50) 64,1 (39)	0,0 (10) 0,0 (11)	0,0 (15)	VANDENBERG et al., 2006 KABEYA et al., 2004 OTTH et al., 2004 ATABAY und AYDIN, 2001
Aztreonam	100,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Azithromycin	81,4 (140)	20,6 (34)		SON et al., 2007
Cefoperazon	97,4 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Cefalotin	94,8 (96) 100,0 (39)	36,4 (11)	26,7 (15)	KABEYA et al., 2004 ATABAY und AYDIN, 2001
Chloramphenicol	98,0 (50) 30,2 (96) 0,0 (39)	0,0 (11)	6,7 (15)	OTTH et al., 2004 KABEYA et al., 2004 ATABAY und AYDIN, 2001
Ciprofloxacin	0,0 (140) 3,3 (61) 2,0 (50)	2,9 (34) 0,0 (10)		SON et al., 2007 VANDENBERG et al., 2006 OTTH et al., 2004
Clindamycin	90,0 (140)	82,4 (34)		SON et al., 2007

Antibiotikum	Zahl resistenter Stämme			Literaturquelle
	A. <i>butzleri</i> % resistent (n)	A. <i>cryaerophilus</i> % resistent (n)	A. <i>skirrowii</i> % resistent (n)	
Danofloxacin	0,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Enrofloxacin	0,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Erythromycin	4,3 (6) 21,3 (61) 2,0 (50) 0,0 (96)	0,0 (34) 0,0 (10)	0,0 (15)	SON et al., 2007 VANDENBERG et al., 2006 OTTH et al., 2004 KABEYA et al., 2004
Gentamicin	0,0 (140) 0,0 (61) 0,0 (50)	0,0 (34) 0,0 (10)		SON et al., 2007 VANDENBERG et al., 2006 OTTH et al., 2004
Kanamycin	0,0 (96)	0,0 (11)	0,0 (15)	KABEYA et al., 2004
Methicillin	96,9 (96)	100,0 (11)	100,0 (15)	KABEYA et al., 2004
Mezlocillin	97,4 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Nalidixinsäure	23,6 (140) 18,0 (61) 63,5 (96) 0,0 (39)	8,8 (34) 0,0 (10) 9,1 (11)	20,0 (15)	SON et al., 2007 VANDENBERG et al., 2006 KABEYA et al., 2004 ATABAY und AYDIN, 2001
Oxacillin	100,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Penicillin G	100,0 (39)			ATABAY und AYDIN, 2001
Streptomycin	0,0 (96)	0,0 (11)	0,0 (15)	KABEYA et al., 2004
Sulfamethoxazol- Trimethoprim	68,8 (96) 100,0 (39)	72,7 (11)	53,3 (15)	KABEYA et al., 2004 ATABAY und AYDIN, 2001
Tetracyclin	0,0 (140) 0,0 (61) 0,0 (50) 0,0 (96)	0,0 (34) 0,0 (10) 0,0 (11)	0,0 (15)	SON et al., 2007 VANDENBERG et al., 2006 OTTH et al., 2004 KABEYA et al., 2004
Vancomycin	100,0 (96)	100,0 (11)	100,0 (15)	KABEYA et al., 2004

### **3 Material und Methoden**

Im ersten Teil der Arbeit wurden Puten- und Schweinefleischproben aus dem Berliner Filial- und Einzelhandel kulturell und molekularbiologisch auf das Vorhandensein von *Arcobacter spp.* untersucht. Wie bereits in der Literatur dargestellt, gibt es in der Routinediagnostik derzeit noch keine standardisierte Untersuchungsmethode für *Arcobacter*. Als Nachweisverfahren wurde die von HOUF et al. (2001b) empfohlene kulturelle Methode und die von ihnen entwickelte speziesspezifische mPCR-Analyse ausgewählt (HOUF et al., 2000).

Im zweiten Teil wurde das kulturelle Isolierungsprotokoll nach HOUF et al. (2001b) mit der von JOHNSON und MURANO (1999a, b) beschriebenen kulturellen Nachweismethode sowie der modifizierten JOHNSON-MURANO-Methode nach SCULLION et al. (2004) auf ihre Selektivität geprüft und verglichen. Dabei wurden sowohl die Anreicherungen als auch die kulturellen Ergebnisse mittels der von HOUF et al. (2000) entwickelten speziesspezifischen mPCR-Analyse untersucht und verglichen. Als Untersuchungsmaterial diente Putenfleisch aus dem Berliner Filial- und Einzelhandel.

#### **3.1 Qualitative Untersuchung von Puten- und Schweinefleischproben auf *Arcobacter spp.* nach HOUF et al. (2000, 2001b)**

##### **3.1.1 Untersuchungsmaterial und Probennahme**

Im Rahmen der Untersuchung von Lebensmitteln auf die Kontamination mit *Arcobacter spp.* wurden insgesamt 244 Puten- und Schweinefleischproben aus dem Berliner Filial- und Einzelhandel gezogen. Die Proben wurden im Zeitraum zwischen August 2005 und Juli 2006 entnommen, und zwar über ein möglichst gleichmäßig verteiltes Beprobungsgebiet und in regelmäßigen Zeitabständen, sodass eine Mehrfachuntersuchung von Material aus denselben Chargen des Herstellers vermieden wurde. Sowohl gekühlte, fertig abgepackte Ware aus dem SB-Bereich als auch loses Beprobungsmaterial an der Supermarkt-Theke und den Verkaufsständen auf Berliner Marktplätzen sind aufgekauft worden. Tabelle 3.1. gibt Auskunft über Anzahl und Art der untersuchten Proben.

Tabelle 3.1.: Probenart und Anzahl der Puten- und Schweinefleischerzeugnisse (n = 244)

<b>Tierart</b>	<b>Probenmaterial</b>	<b>Anzahl</b>
Pute	Putenbrust	50
	Putenflügel	21
	Puteninnereien (n = 26)	
	• Herzen	7
	• Leber	10
	• Mägen	9
	Putenkeule (n = 39)	
	• Oberkeule	16
	• Unterkeule	23
	Putenkleinfleisch	4
	Putenbratwurst	5
	Putenhackfleisch	5
	Cevapcici	1
		<b>insgesamt</b>
Schwein	Schweinerücken	15
	Schweinehaxen/Spitzbein	12
	Schweinebauch	12
	Schweinebrust/Brustspitze	6
	Schweineinnereien (n = 20)	
	• Herzen	9
	• Leber	7
	• Lunge	1
	• Nieren	3
	Schweineschwanz	5
	Schweinekeule	4
	Schweinenacken/Hals	4
	Fleischabschnitte (n = 14)	
	• Gulasch	3
	• Hackfleisch/Mett	7
	• Schnitzel	4
	Schweineohr	1
		<b>insgesamt</b>

Die Proben wurden direkt vom Händler zum institutseigenen Labor transportiert. Der Probeneingang wurde dokumentiert, indem das Kaufdatum, der Untersuchungsbeginn, das Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) bzw. Verbrauchsdatum (VD), die Verpackungsart und die Probenbezeichnung erfasst wurden. Der Beginn der Untersuchung erfolgte am Kauftag oder

aber höchstens zwei Tage später, wobei diese Proben bis zum Testbeginn im Kühlschrank (Temperatur:  $4 \pm 2$  °C) gelagert wurden.

### 3.1.2 Nährmedien, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Für den kulturellen Nachweis von *Arcobacter* wurden die von HOUF et al. (2001b) entwickelten Medien eingesetzt und für die genotypische Identifizierung wurde die mPCR-Analyse mit den von HOUF et al. (2000) beschriebenen Primern angewendet.

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Nährmedien - Anreicherungsmedium und Nachweismedium - wurden nach den Anweisungen von HOUF et al. (2001b) in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellt und eingesetzt. Die Laborabteilung ist durch die AKS Hannover gemäß der ISO/IEC 17025:2005 seit 01.07.2004 akkreditiert.

Nachstehend sind die Nähr- und Zusatzstoffe der Medien mit Angabe von Konzentrationen und Hersteller sowie weitere verwendete Reagenzien und Materialien aufgelistet:

#### 3.1.2.1 Anreicherungsmedium

- *Arcobacter*-Selektivanreicherung nach HOUF et al. (2001b):

- 24,0 g/l *Arcobacter*-Bouillon-Basis (Oxoid, Nr. CM 965 B)
- 100,0 mg/l 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich, Nr. F 6627)
- 64,0 mg/l Trimethoprim (Sigma-Aldrich, Nr. T 7883)
- 32,0 mg/l Novobiocin Sodium Crystalline (Sigma-Aldrich, Nr. N 1628)
- 16,0 mg/l Cefoperazone Sodium (Sigma-Aldrich, Nr. C 4292)
- 10,0 mg/l Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Nr. A 4888)
- 50,0 ml/l lysiertes Pferdeblut (Oxoid, Nr. SR 48 C)
- 900,0 ml Aqua destillata

#### 3.1.2.2 Nachweismedium

- *Arcobacter*-Selektivagar nach HOUF et al. (2001b):

- 24,0 g/l *Arcobacter*-Bouillon-Basis (Oxoid, Nr. CM 965 B)
- 12,0 g/l Agar Nr. 3 (Oxoid, Nr. LP 13 B)
- 100,0 mg/l 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich, Nr. F 6627)
- 64,0 mg/l Trimethoprim (Sigma-Aldrich, Nr. T 7883)
- 32,0 mg/l Novobiocin Sodium Crystalline (Sigma-Aldrich, Nr. N 1628)
- 16,0 mg/l Cefoperazone Sodium (Sigma-Aldrich, Nr. C 4292)
- 10,0 mg/l Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Nr. A 4888)
- 900,0 ml Aqua destillata

### 3.1.2.3 Reagenzien, Materialien und Geräte

- *Gramfärbung:*
  - Grams Kristallviolett Lösung (Merck, Nr. 1.09218)
  - Lugols Lösung stabilisiert (Merck, Nr. 1.00567)
  - Entfärbelösung (Merck, Nr. 1.10218)
  - Grams Safranine Lösung (Merck, Nr. 1.09217)
  
- *Cytochromoxidasetest:*
  - Oxidase-Test (Merck, Nr. 1.13300)
  
- *Katalasetest:*
  - 3 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung
  
- *Materialien und Geräte*
  - Anaerobiertöpfe (Merck, Typ Anaerocult)
  - Beutelwalkmischgerät (Interscience, Typ BagMixer 400)
  - Brutschrank, 30 °C (Memmert, Typ BE 700)
  - CampyGen™ (Oxoid, Nr. CN 0025 A)
  - DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen, Nr. 69504)
  - Einwaagen (Sartorius, Typ 4100, 3600, LP 4200 S)
  - Mikrobank (Mast Diagnostika, Cryobank™)
  - Mikroskop (Carl Zeiss, Typ Standard KF 2)
  - Thermomixer (Eppendorf, Typ 5437)
  - Thermocycler (BIO-RAD, iCycler iQ™)
  - UV-Transilluminator (Alpha Innotech, Alphamager)
  - Zentrifuge (Eppendorf, Typ 5402)
  - Pinzette, Schere, Ösen (Ø 3 - 4 mm)
  - Probenbeutel
  - Weithalslerlenmeyerkolben
  - Objektträger
  - Hohlschliffobjektträger, Deckgläser, Vaseline
  
- *Referenzstämme*
  - *A. butzleri* (DSMZ, DSM-Nr. 7301)
  - *A. butzleri* (DSMZ, DSM-Nr. 8739)
  - *A. cryaerophilus* (DSMZ, DSM-Nr. 7289)
  - *A. skirrowii* (DSMZ, DSM-Nr. 7302)

### **3.1.2.4 Herstellung der Medien**

#### **Anreicherungsmedium**

Zur Herstellung von 1 Liter flüssigem Nährmedium wurden die unter 3.1.2.1 aufgeführten Nähr- und Zusatzstoffe in den entsprechenden Konzentrationen eingewogen.

Für die Aufbereitung des Basismediums wird *Arcobacter*-Bouillon-Basis in 900 ml destilliertem Wasser unter Rühren auf einem Magnetrührer vollständig gelöst und direkt in einem Autoklaven für 15 min bei 121 °C sterilisiert. Der Nährbodenansatz wird mit einer Temperatur von 70 - 80 °C dem Autoklaven entnommen und auf dem Magnetrührer bis ca. 50 °C abgekühlt. Die anschließende Zugabe von 50 ml lysiertem Pferdeblut und der beiden vorbereiteten Antibiotikallösungen dient dazu, die Selektivität des Nährmediums zu erhöhen. Antibiotikallösung 1 enthält 5-Fluorouracil, Amphotericin B, Novobiocin sowie Cefoperazon und Antibiotikallösung 2 enthält Trimethoprim, jeweils gelöst in 25 ml destilliertem Wasser. Nach homogenem Einmischen steht die Nährbouillon bei einem pH-Wert von  $7,2 \pm 0,2$  für das Anreichern zur Verfügung.

#### **Nachweismedium**

Zur Herstellung von 1 Liter festem Nährmedium werden die unter 3.1.2.2 aufgeführten Nähr- und Zusatzstoffe in den entsprechenden Konzentrationen eingewogen. Anschließend wird *Arcobacter*-Bouillon-Basis und der Agarzusatz Nr. 3 in 950 ml destilliertem Wasser unter Rühren mit einem Magnetrührer vollständig gelöst und das zubereitete Basismedium im Autoklaven für 15 min bei 121 °C sterilisiert. Der Nährbodenansatz wird auch hier mit 70 - 80 °C dem Autoklaven entnommen, unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt und mit den vorbereiteten Antibiotikallösungen vermischt: Lösung 1 enthält 5-Fluorouracil, Amphotericin B, Novobiocin sowie Cefoperazon und Lösung 2 enthält Trimethoprim; jeweils gelöst in 25 ml destilliertem Wasser. Unter leichtem Rühren wird der flüssige Agar homogenisiert und danach in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Agars (pH-Wert  $7,2 \pm 0,2$ ) und Trocknen der Platten wird das Nährmedium bis zu seiner Verwendung bei ca. 7 °C gelagert.

### **3.1.3 Probenaufbereitung und Kultivierung**

Zunächst erfolgte das Ansetzen der Selektivanreicherung nach HOUF et al. (2001b). Dafür wurden 25 g des Untersuchungsmaterials mit einer sterilen Pinzette und unter Zuhilfenahme

einer sterilen Schere entnommen. Das gewonnene Material wurde in sterile Stomacherprobenbeutel mit Filtereinsatz gegeben, mit 225 ml *Arcobacter*-Bouillon aufgefüllt (Verhältnis 1:10) und in einem Stomacher für eine Minute bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert.

Die anschließende Inkubation erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Anaerobiertopf mit OXOID CampyGen™ für 48 h bei 30 °C ( $\pm 1$  °C). Hier ist anzumerken, dass die von HOUF et al. (2001b) angegebene Inkubationstemperatur 28 °C beträgt. Das Inkubieren bei einer Temperatur von 30 °C benutzten bereits SCULLION et al. (2004). Nach der Bebrütung der Anreicherung wurde mit einer sterilen Öse Material entnommen (ca. 10  $\mu$ l), auf das feste Selektivmedium als Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich mit dreimaligem Ausglühen der Impföse aufgetragen und mikroaerophil in einem Anaerobiertopf für 48 h bei 30 °C ( $\pm 1$  °C) bebrütet, wiederum 2 °C höher als von HOUF et al. (2001b) angegeben. Die Kultivierung wurde im Doppelansatz durchgeführt. Parallel zu den Lebensmittelproben wurden die Referenzstämme mitgeführt.

### **3.1.4 Isolierung, Differenzierung und Auswertung**

#### **3.1.4.1 Makroskopische Untersuchung**

Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Anaerobiertopf erfolgte eine makroskopische Begutachtung der Agarplatten. Dabei wurde nach Kolonien gesucht, die folgende Charakteristika aufwiesen:

- rund, mit einem Durchmesser von maximal 2 mm
- semitranslucent bis leicht gelblich
- glatt und
- erhaben.

#### **3.1.4.2 Mikroskopische Untersuchung**

Für verdächtige Kolonien erfolgte eine vorläufige Identifizierung mittels mikroskopischer und biochemischer Auswertung. Nativpräparate der Bakterien wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bei 1000-facher Vergrößerung auf Beweglichkeit (Motilitätsprüfung) überprüft. Dabei zeigt *Arcobacter* spp. im hängenden Tropfen eine

schnelle, das Blickfeld durchquerende Bewegung mit typisch spiraligdrehenden, korkenzieherartigen Windungen. Für nach Gramfärbung im Lichtmikroskop innerhalb des Hellfeldes bei einer 1000-fachen Vergrößerung (Ölimmersion) als kleine, gramnegativ (Rotfärbung) beurteilte, kommaförmige, gebogene Stäbchen erfolgte eine weiterführende biochemische Differenzierung.

#### **3.1.4.3 Biochemische Untersuchung**

Zur Beurteilung der Oxidasereaktivität wurden die verdächtigen Kolonien auf das imprägnierte, weiße Filterpapier verrieben. Bei einer Verfärbung nach dunkelblau-violett innerhalb von 10 - 30 Sekunden galt die Reaktion als positiv. Die Katalasereaktion wurde als positiv bewertet, wenn das auf einem Objektträger in einem Tropfen einer 3 %igen Wasserstoff-Peroxid-Lösung eingeriebene Koloniematerial innerhalb von wenigen Sekunden Bläschen bildete.

#### **3.1.4.4 Molekularbiologische Untersuchung**

Das molekularbiologische Identifizieren der Keime erfolgte mittels multiplex Polymerase chain reaction (mPCR). Bei der Polymerasekettenreaktion (von K. B. MULLIS 1986 eingeführt, Nobelpreis für Chemie 1993) handelt es sich um eine In-vitro-Technik, welche gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von Startermolekülen einen neuen DNA Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template DNA. Als Startermoleküle werden zwei synthetische DNA-Oligonukleotidketten (Primer) verwendet, welche gegenläufig orientiert sind. Ein Primer wird für die Vorwärtsrichtung und der andere entsprechend weiter distal für die Gegenrichtung gebraucht. Hiermit wird das Zwischenstück bestimmt, welches amplifiziert werden soll, das heißt, es erfolgt eine gezielte Vervielfältigung der DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Bei einer multiplex PCR wird mehr als ein Primerpaar eingesetzt, um zwei oder mehrere Gene eines Pathogens oder verschiedener Pathogene während eines PCR-Durchgangs zu vervielfältigen und nachzuweisen. In der vorliegenden Studie wurden die von HOUF et al. (2000) für den simultanen Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* beschriebenen Primer verwendet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches lässt sich das amplifizierte, spezifische Fragment als Bande erkennen und analysieren. Bei jedem PCR-Lauf wurden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt.

Als Material für die PCR-Analyse diente die BHI-Anreicherung (Brain-Heart-Infusion) der Reinkulturen bzw. die Anreicherungsbouillon (Punkt 3.2: Vergleich der Nachweisverfahren). Dazu wurde jeweils 1 ml der Anreicherung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 7500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das verbleibende Pellet für die Aufreinigung weiterverwendet werden.

### DNA Extraktion

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem Qiagen DNeasy™ Tissue Kit. Mit dieser Methode können in einem Schritt Bakterienkulturen gelöst, die DNA isoliert und Verunreinigungen entfernt werden. Letzteres lässt sich durch zwei Waschschriffe bewirken. Die Elution der DNA erfolgt mit einem speziellen, im Kit mitgelieferten Puffer. Das Pellet wurde in 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Bestandteil des Kits) durch Resuspendieren und Vortexen gelöst und bei 55 °C ein bis drei Stunden inkubiert. Das Gemisch wurde nach Beendigung der Lyse mit 200 µl AL-Puffer versetzt, 15 Sekunden gevortext und für 10 Minuten im Thermomixer bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurden die Proben 15 Sekunden gemischt und in spezielle Filtersäulen, die in Auffanggefäße eingesetzt waren, umgefüllt und bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert. Die DNA adsorbierte an der Silikamembran der Filter. Die flüssigkeitsgefüllten Auffangbehälter mussten verworfen und durch neue ersetzt werden. Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurden die Säulen wieder bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säulen in frische Auffanggefäße gesetzt. Anschließend wurde 500 µl AW2-Puffer zugegeben und bei 14000 rpm drei Minuten zentrifugiert. Diese beiden Waschschriffe dienten dem Entfernen noch vorhandener Verunreinigungen. Nachdem die Filter mit der DNA auf ein Eppendorfgefäß gesetzt worden waren, erfolgte durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer, einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und nach Zentrifugation bei 8000 U/min für eine Minute das Herauslösen der DNA aus dem Filter. Das Eluat wurde in Eppendorfgefäßen aufgefangen und für die PCR verwendet.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf dem Prinzip der semikonservativen Replikation, bei der die DNA in zwei Hälften aufgetrennt wird und die neuen Hälften jeweils komplementär hergestellt werden. Sie ist ein Typus der DNA-Verdopplung, mit dem sich eine ausgewählte DNA-Sequenz in vitro exponentiell vervielfältigen lässt. Das Reaktionsgemisch für eine PCR-Reaktion enthält: magnesiumhaltigen Puffer, im Überschuss die vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate dATP,

dCTP, dGTP und dTTP, DNA-Polymerase und die Primer.

Allgemein setzt sich ein PCR-Lauf aus einer variablen Anzahl von Reaktionszyklen zusammen, wobei jeder aus drei Reaktionsschritten besteht: Im ersten Reaktionsschritt, der Denaturierung, erfolgt die thermische Spaltung (bei 90 - 95 °C) der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge durch Lösung der Wasserstoffbrücken. Im nächsten Schritt, dem Annealing, kommt es durch das Abkühlen des Gemisches zu einer Anlagerung von Komplementärsträngen. Hierbei lagern sich die Primer an der entsprechend komplementären Sequenz der Probe an. Dies geschieht bevorzugt bei einem von den eingesetzten Primern abhängigen Temperaturoptimum (45 - 60 °C). Die Primer dienen mit ihrem 3'-Ende nun als Replikationsstartpunkt für die DNA-Polymerase. Verwendet wird die hitzestabile Taq-Polymerase. Sie wird aus dem thermophilen Bacterium *Thermophilus aquaticus* (abgekürzt: Taq) gewonnen und ihr Aktivitätsoptimum liegt bei ca. 72 °C. Diese letztgenannte Eigenschaft der Taq-Polymerase ermöglicht einen durchgängigen Ablauf der PCR-Reaktion, da sie durch die hohen Temperaturen im ersten Reaktionsschritt kaum denaturiert wird und somit auch nicht substituiert werden muss. Im dritten und letzten Reaktionsschritt, der Extension, findet die Elongation der Primer statt. Hierbei werden Desoxy-Nukleosidtriphosphate komplementär zum Mutterstrang nach dem Prinzip der Basenpaarung in den wachsenden Strang eingebaut. Dieser Vorgang wird durch die Taq-Polymerase katalysiert, die dabei jeweils einen Pyrophosphatrest abspaltet.

Nach Durchlauf des ersten Reaktionszyklus sind somit Primärkopien des Mutterstranges mit einem durch die Primer definierten Startpunkt und unbekanntem 3'-Endpunkt entstanden. Beim nächsten Annealing lagert sich nun der zweite Primer an diese entsprechend an und dient als Replikationsstartpunkt für einen neuen Strang, der Sekundärkopie, deren 3'-Ende mit dem ersten Primer endet. Somit sind nach zwei Durchläufen die ersten Transkripte entstanden, die nur die gewünschte Sequenz umfassen. In den nachfolgenden Zyklen erfolgt dann eine exponentielle Vermehrung dieser Sequenzen. Nach den Amplifizierungszyklen findet in der Regel noch einmal eine finale Elongationsphase (delay last step) statt, in der alle begonnenen Elongationen beendet werden sollen.

Die beschriebenen Reaktionsschritte erfolgen automatisiert in einem Thermocycler mit einem temperierbaren Reaktionsraum, in den die PCR-Probengefäße gestellt werden. Die Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt und die Zyklenzahl sind individuell

programmierbar.

Das für die vorliegende Studie hergestellte PCR-Reaktionsgemisch ist in Tabelle 3.2. angegeben:

Tabelle 3.2.: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Amplifizierung

	Konzentration	Volumen je Ansatz in µl	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer (incl. 25 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 x	5,0	1 x
dNTP-Mix	2,0 mM	5,0	0,2 mM
Primer BUTZ	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer ARCO	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer SKIR	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer ARCO	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer CRY1	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer CRY2	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Hot Star Taq-Polymerase	5 U/µl	0,2	1 U/50 µl
DNA Probe		5,0	
H <sub>2</sub> O		22,8	
		Σ 50,0	

Die PCR-Analyse nach HOUF et al. (2000) ermöglicht einen zeitgleichen Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Hierbei kamen folgende Primer zum Einsatz (Tabelle 3.3.):

Tabelle 3.3.: Basensequenz der Primer nach HOUF et al. (2000)

	Bezeichnung der Primer	Position	Nukleotidsequenz
<i>A. butzleri</i> 16S rRNA	BUTZ	959 - 983	5'-CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3'
	ARCO	1357 - 1338	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'
<i>A. skirrowii</i> 16S rRNA	SKIR	705 - 723	5'-GGCGATTTACTGGAACACA-3'
	ARCO	1358 - 1339	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'
<i>A. cryaerophilus</i> 23S rRNA	CRY1	105 - 124	5'-TGCTGGAGCGGATAGAAGTA-3'
	CRY2	359 - 340	5'-AACAACTACGTCCTTCGAC-3'

Eine Differenzierung in Bio- bzw. Serotypen erfolgte nicht.

Jeweils 50 µl Reaktionsgemisch wurden pro Reaktion in PCR-Reaktionsröhrchen pipettiert. Zur Überprüfung der Reaktion wurden immer Positivkontrollen (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*,

*A. skirrowii*, DSMZ) und eine no template control (NTC; Aqua destillata) mitgeführt. Für den PCR-Durchlauf wurde der Thermocycler wie folgt programmiert:

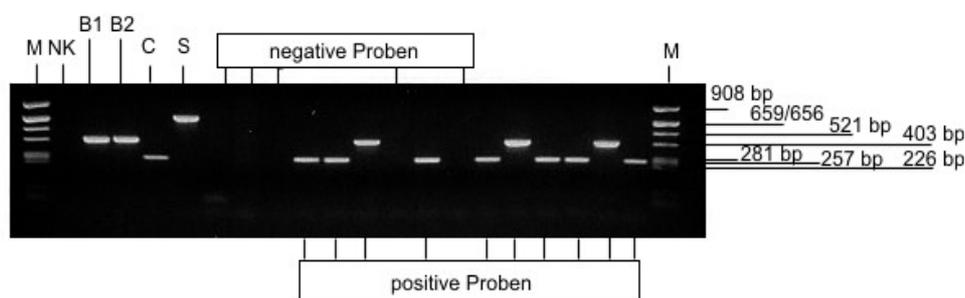
- **Zyklus 1:** Denaturierung  
Step 1: 95 °C 15 min
  
- **Zyklus 2:** (35 x) Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Extension)  
Step 1: 95 °C 60 sec  
Step 2: 59 °C 90 sec  
Step 3: 72 °C 90 sec
  
- **Zyklus 3:** Extension/Elongation  
Step 1: 72 °C 7 min
  
- **Zyklus 4:**  
Step 1: 4 °C (∞)

#### Sichtbarmachung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese

Bei der klassischen PCR mit Polyacrylamid- und Agarosegelen werden die PCR-Produkte nach Ablauf aller PCR-Zyklen detektiert, wobei die Produkte nach Anlegen einer Spannung anhand ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode, die Wanderungsrate der Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der Basenpaare. Parallel zum analysierten DNA-Amplifikat wird ein Längenstandard mit bekanntem DNA-Fragment aufgetragen, anhand dessen die Größe von PCR-Produkten abgeschätzt werden kann. Die Größe allein ist häufig aussagekräftig genug zur Interpretation der aufgetrennten Sequenzen. Das zugegebene Ethidiumbromid stellt ein den Acridinen strukturverwandten Fluoreszenzfarbstoff dar, der sich mit sehr hoher Affinität zu Einzel- und Doppelstrang-DNA zwischen zwei Basenpaare schiebt. Das kurzwelligere UV-Licht im Bereich von 254 bis 260 nm wird von Nukleinsäuren direkt absorbiert und auf das Ethidiumbromid übertragen, während langwelliges Licht im 302 bis 306 nm Bereich direkt von Ethidiumbromid absorbiert wird. In beiden Fällen kommt es zu einer Emission im sichtbaren orangeroten Bereich von 590 nm. Die angefärbten Produkte sind dann unter UV-Licht sichtbar und können photographisch erfasst werden. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der vorliegenden Studie erfolgte über eine horizontale Gelelektrophorese auf Agarosegelen. Agarose besteht

aus einem linearen Polysaccharid und wird aus einer roten Meeresalge gewonnen. Die hier verwendeten Gele waren auf eine Konzentration von 1,5 % Agarose eingestellt. Dazu wurden 2,25 g Agarose in 150 ml 1 x TBE-Puffer bzw. 4,5 g Agarose in 300 ml 1 x TBE-Puffer (kleines bzw. großes Gel) gelöst. Der 1 x TBE-Puffer (TBE = Tris-Borsäure-EDTA) wurde zuvor aus einem 10 x TBE-Puffer-Konzentrat durch Verdünnung mit Aqua destillata im Verhältnis 1:10 hergestellt. Das Gemisch wurde zum Schmelzen der Agarose so lange bis zum Siedepunkt erhitzt, bis sich eine klare und schlierenfreie Lösung ergab. Nach dem Abkühlen auf 52 - 53 °C wurden 7,5 µl bzw. 15 µl Ethidiumbromid darunter gemischt und die noch flüssige Agaroselösung in die Gelkammer mit den bereits eingesetzten Kämmen gegossen. Nach Erstarren des Geles wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer, die 1850 ml incl. 92,5 µl Ethidiumbromid bzw. 1700 ml incl. 85 µl 1 x TBE-Puffer enthielt, überführt.

Zum Auftragen der PCR-Produkte wurden jeweils 10 µl der DNA-Lösung mit 2 µl Geltaşchenpuffer vermischt. Danach wurden 10 µl der Amplifikate und des Markers (Längenstandard; pBR322 DNA/Alu I, Marker 20, Fermentas) in die Vertiefungen des Gels pipettiert und bei einer Spannung von 120 Volt 60 Minuten aufgetrennt. Nach gelelektrophoretischer Behandlung des Reaktionsgemisches konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe des fluoreszierenden Ethidiumbromids auf dem UV-Transilluminator als Bande sichtbar gemacht, mit Marker und Positivkontrollen verglichen und deren Länge bestimmt werden (Abbildung 3.1). Zur Dokumentation wurden die Bilder am Videoarbeitsplatz als Bilddatei gespeichert oder ausgedruckt bzw. mit einer Polaroid-Kamera aufgenommen.



M = Marker, NK = Negativkontrolle, B1 = *A. butzeri* (7301), B2 = *A. butzeri* (8739),  
 C = *A. cryaerophilus*, S = *A. skirrowii*  
 bp für *A. butzeri* = 401, für *A. cryaerophilus* = 257 und für *A. skirrowii* = 641

Abbildung 3.1: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate

### 3.1.5 Schematische Darstellung der Nachweisverfahren

Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b):

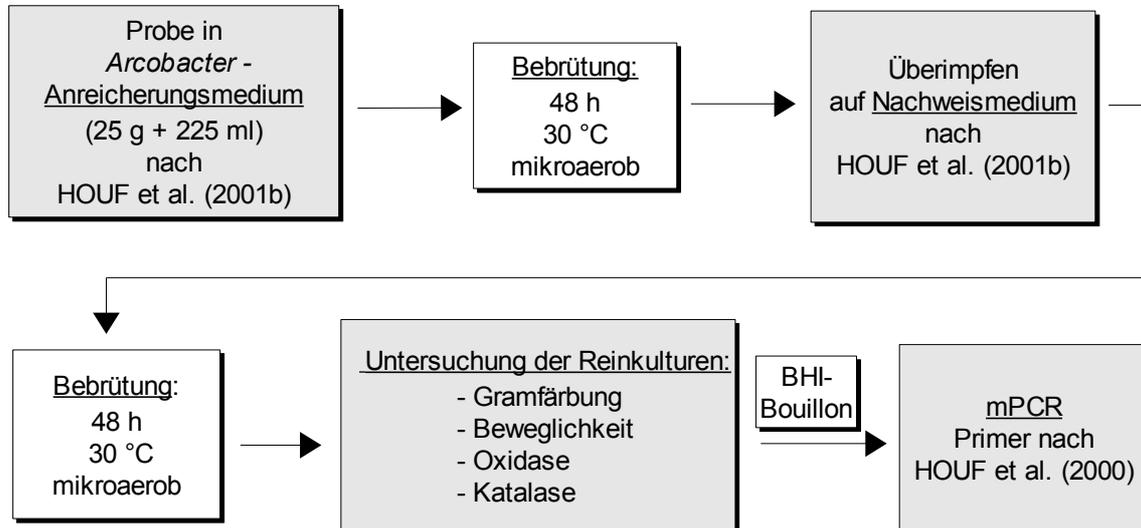


Abbildung 3.2: Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b)

### 3.1.6 *Arcobacter*-Kontrollstämmе

Für die Differenzierung der *Arcobacter*-Isolate aus den Proben und als Kontrollstamm kamen *Arcobacter*-Stämme aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) zur Anwendung. Die verwendeten Stämme lagerten im Stammhaltungssystem für Mikroorganismen (Cryobank™, Fa. Mast Diagnostika, Deutschland) bei -70 °C. Die Aktivierung der Stämme wurde nach den Vorgaben der DSMZ durchgeführt.

Für *A. butzleri* wurden die Bakterienstämme DSM 7301 und 8739, für *A. cryaerophilus* der Stamm DSM 7289 und für *A. skirrowii* der Stamm DSM 7302 verwendet. Sie wurden für die Durchführung innerhalb der Prüfung der Nachweismethode nach HOUF et al. (2001b) und JOHNSON und MURANO (1999a, b - Teil 2 der vorliegenden Arbeit) als Positivkontrollen eingesetzt sowie deren DNA in der molekularbiologischen Methode für die positiven Kontrollbanden im Agarosegel genutzt.

### **3.1.6.1 Subkultivierung der Gebrauchsstämme**

Die Stämme wurden mittels Mikrobankmethode bei  $-70^{\circ}\text{C}$  in der Stammsammlung der Laborabteilung des Instituts gelagert. Die Mikrobank<sup>TM</sup> ist ein steriles Kryogefäß mit je 25 porösen Keramikkügelchen in einem speziellen Kryomedium. Die Röhrchen wurden unter sterilen Bedingungen mit je einem Aliquot einer *Arcobacter*-Flüssigkultur beimpft, verschlossen und vorsichtig vermischt. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer Bindung der Mikroorganismen an die Kügelchen; das Medium wurde anschließend abpipettiert, verworfen und das Kryogefäß bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurden unter sterilen Bedingungen zwei bis drei Kügelchen entnommen und auf das jeweilige feste Nährmedium gegeben und mit Hilfe eines Drei-Ösen-Verdünnungsausstrichs verteilt.

### **3.1.6.2 Überprüfung der Vitalität**

Die Vitalität wurde nach der Subkultivierung der *Arcobacter*-Stämme durch die Untersuchung eines Nativpräparates unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe der Ölimmersion auf Beweglichkeit der Bakterienkulturen überprüft.

Anschließend wurde die unter 3.1.4.2 und 3.1.4.3 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

### **3.2 Vergleich kultureller Nachweisverfahren: HOUF et al. (2001b), JOHNSON und MURANO (1999a, b) und JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004)**

#### **3.2.1 Untersuchungsmaterial und Probennahme**

Für den Vergleich der mikrobiologischen Nachweisverfahren von HOUF et al. (2001b), JOHNSON und MURANO (1999a, b) sowie JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004) kamen insgesamt 51 Putenfleischproben aus dem Berliner Filial- und Einzelhandel zur Untersuchung. Die gekühlte, verpackte Ware aus dem SB-Bereich wurde im Zeitraum Mai 2007 bis Juni 2007 im Lebensmittelhandel gezogen.

Die Proben wurden auf direktem Wege vom Händler in das institutseigene Labor transportiert. Der Probeneingang wurde dokumentiert, indem das Kaufdatum, der Untersuchungsbeginn, das Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) bzw. Verbrauchsdatum (VD), die Verpackungsart und Probenbezeichnung erfasst wurden. Der Beginn der Untersuchung erfolgte am Kauftag oder aber spätestens ein Tag ab Kaufdatum, wobei diese Proben bis zum Testbeginn im Kühlschrank gelagert wurden (Temperatur:  $4 \pm 2$  °C).

Die in diesem Teil der Arbeit mittels der von HOUF et al. (2001b) empfohlenen Methode getesteten Putenfleischproben wurden in die Untersuchung des ersten Teils (Punkt 3.1) mit einbezogen.

#### **3.2.2 Nährmedien, Reagenzien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterial**

Die Nährmedien - Anreicherungsmedium und Nachweismedium - wurden, wie von HOUF et al. (2001b) sowie JOHNSON und MURANO (1999a, b) beschrieben, hergestellt und angewandt. Das Herstellen der im Zuge dieser Arbeit verwendeten Selektivmedien erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche.

Nachstehend sind die Nähr- und Zusatzstoffe, deren Konzentration, Hersteller und weitere verwendete Reagenzien und Materialien aufgelistet:

### 3.2.2.1 Anreicherungsmedien

- *Arcobacter-Selektivanreicherung nach HOUF et al. (2001b):*
  - wie unter 3.1.2.1 angegeben
  
- *Arcobacter-Selektivanreicherung nach JOHNSON und MURANO (1999b):*
  - 12,0 g/l Spezial Pepton (Oxoid, Nr. L 72)
  - 6,0 g/l Fleischextrakt (Lab Lemco) (Oxoid, Nr. L 29)
  - 6,0 g/l Hefeextrakt (Oxoid, Nr. L 21)
  - 4,0 g/l Natriumchlorid (Merck, Nr. 1.06404)
  - 2,5 g/l Natriumphosphat, einbasisch (Merck, Nr. 1.06364)
  - 1,6 g/l Kaliumphosphat, dibasisch (Roth, Nr. P 749.1)
  - 2,5 g/l Gallensalze Nr. 3 (Difco, Nr. 213010)
  - 30,0 g/l Aktivkohle (Sigma-Aldrich, Nr. C 4386)
  - 0,5 g/l Natriumthioglykolat (Sigma-Aldrich, Nr. T 0632)
  - 0,5 g/l Natriumpyruvat (Brenztraubensäure) (Sigma-Aldrich, Nr. P 2256)
  - 0,2 g/l 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich, Nr. F 6627)
  - 0,032 g/l Cefoperazone Natrium (Sigma-Aldrich, Nr. C 4292)
  - 2,0 g/l Agar-Agar (Merck, Nr. 1.01614)
  - 950,0 ml Aqua destillata
  
- *Arcobacter-Selektivanreicherung nach JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004):*
  - Rezeptur nach JOHNSON und MURANO (1999b) mit modifizierter Bebrütung

### 3.2.2.2 Nachweismedien

- *Arcobacter-Selektivagar nach HOUF et al. (2001b):*
  - wie unter 3.1.2.2 angegeben
  
- *Arcobacter-Selektivagar nach JOHNSON und MURANO (1999a):*
  - 12,0 g/l Spezial Pepton (Oxoid, Nr. L 72)
  - 6,0 g/l Fleischextrakt (Lab Lemco) (Oxoid, Nr. L 29)
  - 6,0 g/l Hefeextrakt (Oxoid, Nr. L 21)
  - 4,0 g/l Natriumchlorid (Merck, Nr. 1.06404)
  - 2,5 g/l Natriumphosphat, einbasisch (Merck, Nr. 1.06364)
  - 1,6 g/l Kaliumphosphat, dibasisch (Roth, Nr. P 749.1)
  - 0,5 g/l Natriumthioglykolat (Sigma-Aldrich, Nr. T 0632)
  - 0,5 g/l Natriumpyruvat (Brenztraubensäure) (Sigma-Aldrich, Nr. P 2256)
  - 0,032 g/l Cefoperazone Natrium (Sigma-Aldrich, Nr. C 4292)
  - 50,0 ml/l Schafblut, defibriniertes (Oxoid, Nr. SR 51)
  - 20,0 g/l Agar-Agar (Merck, Nr. 1.01614)
  - 900,0 ml Aqua destillata

- *Arcobacter-Selektivagar nach JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004):*
  - Rezeptur nach JOHNSON und MURANO (1999a)

### **3.2.2.3 Reagenzien, Geräte und Materialien**

Wie unter Punkt 3.1.2.3 aufgelistet.

### **3.2.2.4 Herstellung der Medien**

#### **3.2.2.4.1 Anreicherungs- und Nachweismedium nach HOUF et al. (2001b)**

Das Aufbereiten und Kultivieren der Selektivmedien nach HOUF et al. erfolgte wie unter Punkt 3.1.2.4 angegeben.

#### **3.2.2.4.2 Anreicherungs- und Nachweismedien nach JOHNSON und MURANO (1999a, b)**

##### **Anreicherungsmedium**

Zur Herstellung von 1 Liter flüssigem Nährmedium wurden die unter 3.2.2.1 aufgeführten Nähr- und Zusatzstoffe in den dort angegebenen Konzentrationen eingewogen.

Für das Aufbereiten des Basismediums wurden Spezial Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Natriumchlorid, Natriumphosphat, Kaliumphosphat, Gallensalze und Aktivkohle in 950 ml destilliertem Wasser unter Rühren auf einem Magnetrührer vollständig gelöst und direkt in einem Autoklaven für 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Der Nährbodenansatz wurde mit 70 - 80 °C dem Autoklaven entnommen und auf dem Magnetrührer bis ca. 50 °C abgekühlt. Danach erfolgte die sterile Zugabe der vorbereiteten Lösung, und zwar Pyruvat, Thioglykolat sowie 5-Fluorouracil sowie Cefoperazon gelöst in 50 ml destilliertem Wasser. Nach homogenem Einmischen stand die Nährbouillon für die Voranreicherung zur Verfügung.

##### **Nachweismedium**

Für das Herstellen von 1 Liter festem Nährmedium wurden die unter 3.2.2.2 aufgeführten Nähr- und Zusatzstoffe in den entsprechenden Konzentrationen eingewogen. Anschließend

wurden Spezial Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Natriumchlorid, Natriumphosphat sowie Kaliumphosphat in 900 ml destilliertem Wasser unter Rühren mit einem Magnetrührer vollständig gelöst und das zubereitete Basismedium im Autoklaven für 15 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Der Nährbodenansatz wurde mit 70 - 80 °C dem Autoklaven entnommen, unter Rühren auf ca. 50 °C abgekühlt und mit 50 ml defribiniertem Schafblut und der vorbereiteten Lösung - Pyruvat, Thioglykolat und Cefoperazon gelöst in 50 ml destilliertem Wasser - angereichert. Unter leichtem Rühren wurde der flüssige Agar homogenisiert und in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Agars (pH-Wert 6,9 ± 0,2) und Trocknen der Platten erfolgte bis zum Beimpfen die Lagerung bei ca. 7 °C.

### **3.2.3 Probenaufbereitung und Kultivierung von *Arcobacter* spp.**

#### **3.2.3.1 HOUF et al. (2001b)**

Zunächst erfolgte das Inokulieren der Selektivanreicherung (HOUF et al., 2001b). Dafür wurden 25 g des Untersuchungsmaterials mit einer sterilen Pinzette und unter Zuhilfenahme einer sterilen Schere entnommen. Das gewonnene Material wurde in sterile Stomacherprobenbeutel mit Filtereinsatz gegeben, mit 225 ml *Arcobacter*-Anreicherung aufgefüllt (Verhältnis 1:10) und in einem Stomacher für eine Minute bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert.

Die anschließende Inkubation erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Anaerobiertopf mit OXOID CampyGen™ für 48 h bei 30 °C (± 1 °C). Hier ist anzumerken, dass die von HOUF et al. (2001b) angegebene Inkubationstemperatur 28 °C beträgt. Das Inkubieren bei einer Temperatur von 30 °C benutzten bereits SCULLION et al. (2004). Nach Inkubation wurde mit einer sterilen Öse Anreicherungs-material entnommen (ca. 10 µl), auf das feste Selektivnährmedium (HOUF et al., 2001b) als Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich mit dreimaligem Ausglühen der Impföse aufgetragen und erneut mikroaerophil in einem Anaerobiertopf für 48 h bei 30 °C (± 1 °C) bebrütet; Im Gegensatz dazu hatten HOUF et al. (2001b) die Inkubationstemperatur mit 28 °C angegeben. Ein Doppelansatz wurde vorgenommen. Parallel zu den Lebensmittelproben wurden die Referenzstämme mitgeführt.

### 3.2.3.2 JOHNSON und MURANO (1999a, b)

Zunächst erfolgte das Ansetzen der JOHNSON-MURANO-Selektivanreicherung (JOHNSON und MURANO, 1999b). Dafür wurden 25 g des Untersuchungsmaterials mit einer sterilen Pinzette und unter Zuhilfenahme einer sterilen Schere entnommen. Das gewonnene Material wurde in sterile Stomacherprobenbeutel gegeben, mit 225 ml der Anreicherungsbouillon aufgefüllt (Verhältnis 1:10) und in einem Stomacher für eine Minute bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert. Der Probenansatz, ein Gemisch aus Probenmaterial und flüssigem Anreicherungsmedium, wurde dann in sterile Weithalslerlenmeyerkolben (250 ml Volumen) umgefüllt. Die anschließende Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen für 48 h bei 30 °C ( $\pm 1$  °C).

Nach Inkubation wurde mittels einer sterilen Öse 1 cm unterhalb der Oberfläche der Anreicherung Probenmaterial entnommen, auf dem JOHNSON-MURANO-Selektivnährboden (JOHNSON und MURANO, 1999a) als Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich mit dreimaligem Ausglühen der Impföse gegeben und aerob für 48 h bei 30 °C ( $\pm 1$  °C) bebrütet. Ein Doppelansatz wurde vorgenommen. Parallel zu den Lebensmittelproben wurden die Referenzstämme mitgeführt.

### 3.2.3.3 JOHNSON-MURANO-modifiziert nach SCULLION et al. (2004)

Die mit der JOHNSON und MURANO-Nachweismethode angesetzten Proben wurden gleichzeitig für die Überprüfung der modifizierten JOHNSON-MURANO-Methode nach SCULLION et al. (2004) verwendet. Die Rezeptur, das Herstellen und Inkubation der Selektivmedien erfolgte wie von JOHNSON-MURANO (1999a, b) beschrieben. Die Modifikation bestand darin, dass ein Überimpfen der Anreicherungen sowohl nach 24-stündiger Inkubation als auch nach den von JOHNSON und MURANO (1999a, b) angegebenen 48 Stunden durchgeführt wurde. Das Überimpfen erfolgte mit einer sterilen Öse als Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich. Ein Doppelansatz wurde vorgenommen. Parallel zu den Lebensmittelproben wurden die Referenzstämme mitgeführt.

Für die drei Nachweisverfahren sind die verwendeten Medien und Inkubationsbedingungen zur Isolierung von *Arcobacter spp.* aus Putenfleisch zur besseren Übersicht in Tabelle 3.4. zusammengefasst.

Tabelle 3.4.: Übersicht der verwendeten Isolierungsmethoden

Methoden	Anreicherungsmedium		Nachweismedium	
	Rezeptur	Inkubation	Rezeptur	Inkubation
HOUF et al. (2001b)	<i>Arcobacter</i> -Bouillon-Basis 5-Fluorouracil Trimethoprim Novobiocin Cefoperazon Amphotericin B Pferdeblut	30 °C microaerob 48 h	<i>Arcobacter</i> -Bouillon-Basis 5-Fluorouracil Trimethoprim Novobiocin Cefoperazon Amphotericin B Agar Nr. 3	30°C microaerob 48 h
JOHNSON und MURANO (1999a, b)	Spezial Pepton Fleischextrakt Hefeextrakt Natriumchlorid Natriumphosphat Kaliumphosphat Natriumthioglykolat Natriumpyruvat Cefoperazon Agar-Agar 5-Fluorouracil Gallensalze Aktivkohle	30 °C aerob 48 h	Spezial Pepton Fleischextrakt Hefeextrakt Natriumchlorid Natriumphosphat Kaliumphosphat Natriumthioglykolat Natriumpyruvat Cefoperazon Agar-Agar Schafblut	30 °C aerob 48 h
JOHNSON und MURANO modifiziert  SCULLION et al. (2004)	wie JOHNSON und MURANO	30 °C aerob  24 h und 48 h	wie JOHNSON und MURANO	30 °C aerob 48 h

### **3.2.4 Isolierung, Differenzierung und Auswertung**

#### **3.2.4.1 Makroskopische Untersuchung**

##### **3.2.4.1.1 HOUF et al. (2001b)**

Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Anaerobiertopf erfolgte eine makroskopische Begutachtung der Agarplatten. Dabei wurde nach Kolonien gesucht, die folgende Charakteristika aufwiesen:

- rund, mit einem Durchmesser von maximal 2 mm
- semitransluzent bis leicht gelblich
- glatt und
- erhaben.

##### **3.2.4.1.2 JOHNSON-MURANO (1999a, b) und JOHNSON-MURANO modifiziert (SCULLION et al., 2004)**

Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Brutschrank erfolgte eine makroskopische Begutachtung der Agarplatten. Dabei wurde nach Kolonien gesucht, die folgende Charakteristika aufwiesen:

- rund, mit einem Durchmesser von bis zu 2 mm
- semitransluzent, gebrochen weiß bis grau
- glatt und
- erhaben.

Die weiterführenden Untersuchungen waren für alle drei Verfahren identisch:

#### **3.2.4.2 Mikroskopische, biochemische und molekularbiologische Untersuchung**

Das Isolieren und Identifizieren der Kolonien, die obige Bedingungen erfüllten, erfolgte wie unter 3.1.4.2 - 3.1.4.4 beschrieben.

### 3.2.5 Schematische Darstellung der Nachweisverfahren

Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b):

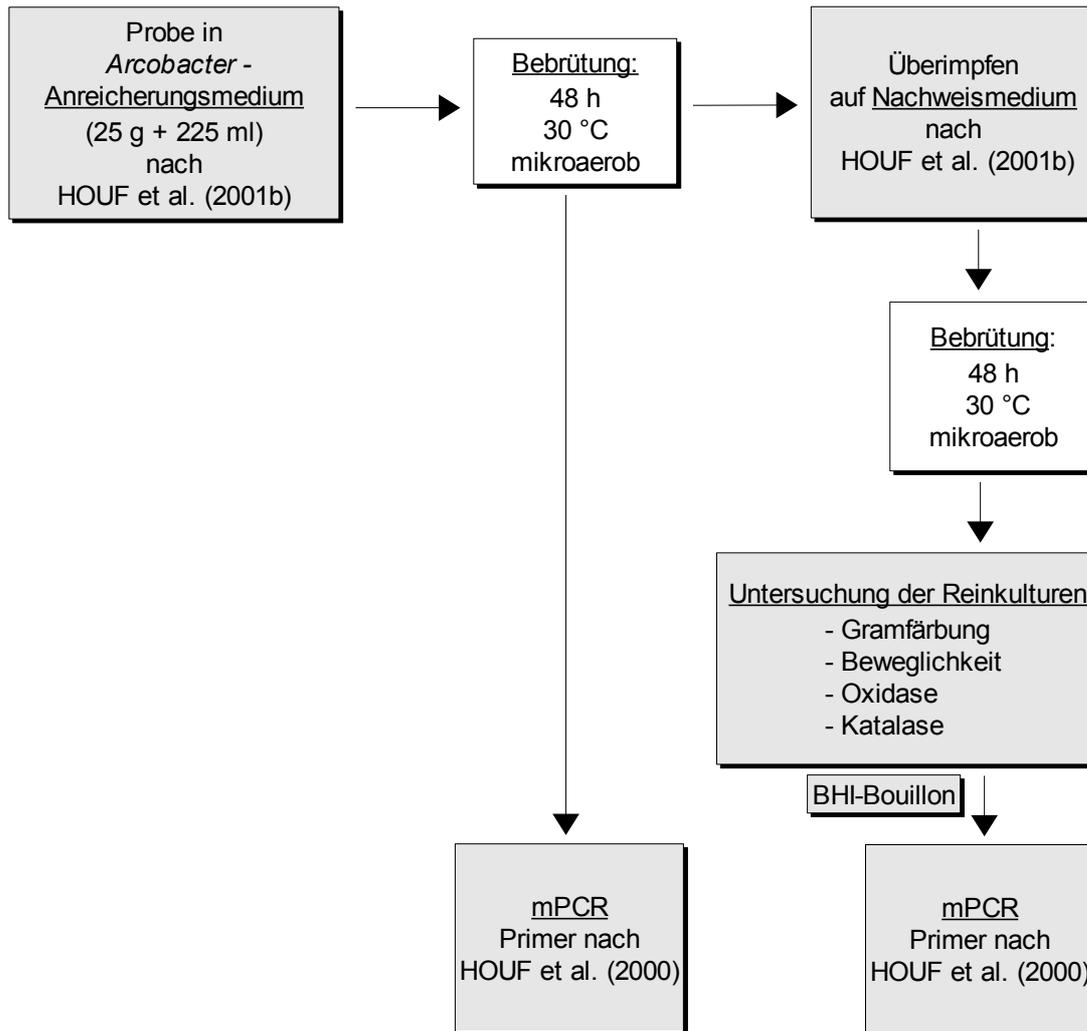


Abbildung 3.3: Ablaufschema HOUF et al. (2000, 2001b)

Ablaufschema JOHNSON-MURANO (1999a, b) und JOHNSON-MURANO modifiziert (SCULLION et al., 2004)

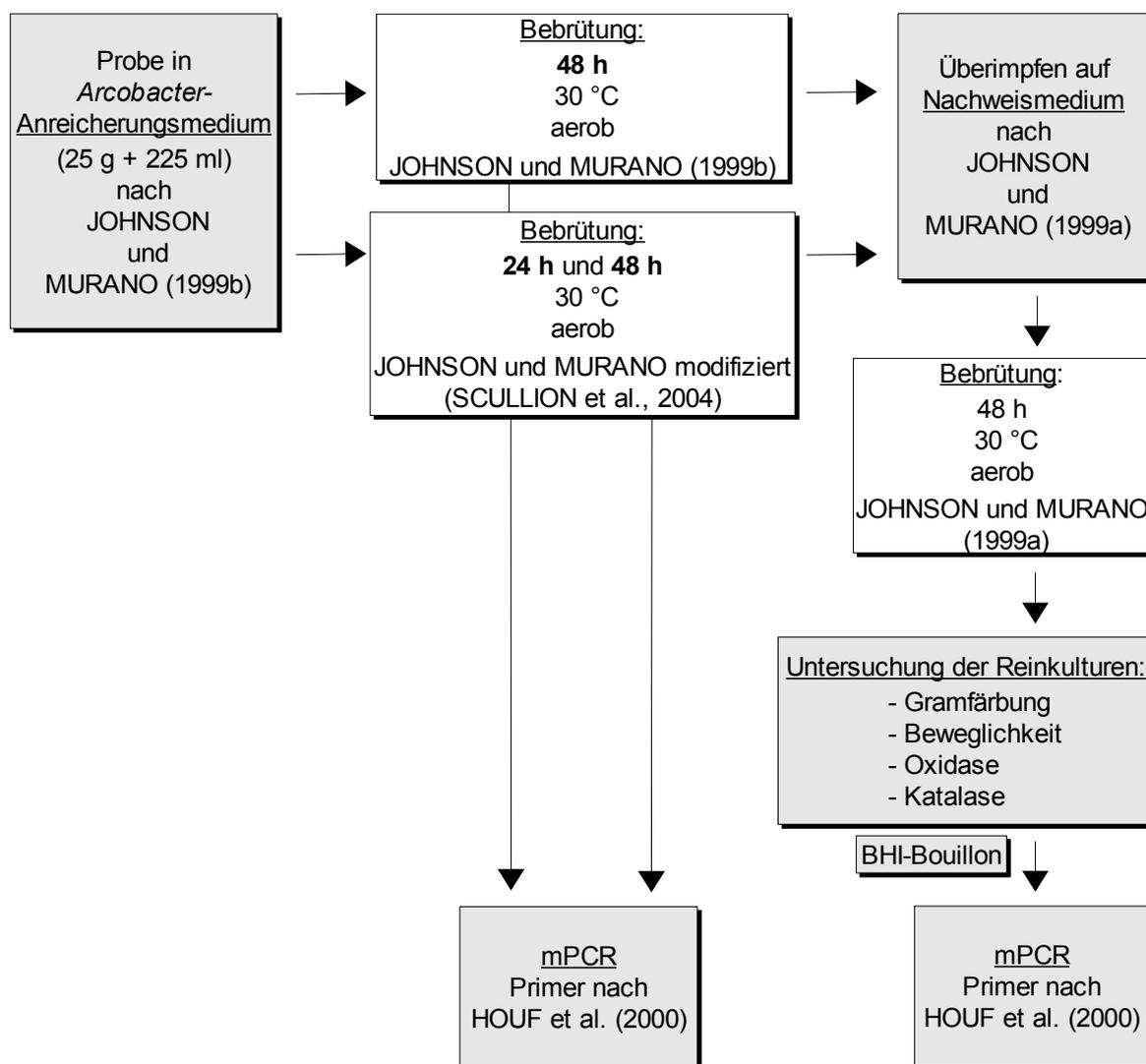


Abbildung 3.4: Ablaufschema JOHNSON-MURANO (1999a, b) und JOHNSON-MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004)

### 3.2.6 *Arcobacter*-Kontrollstämme

Wie unter Punkt 3.1.6 angegeben.

#### 3.2.6.1 Subkultivierung der Gebrauchsstämme

Wie unter Punkt 3.1.6.1 angegeben.

#### 3.2.6.2 Überprüfung der Vitalität

Wie unter Punkt 3.1.6.2 angegeben.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Qualitative Untersuchung von Puten- und Schweinefleischproben auf *Arcobacter* spp. nach HOUF et al. (2001b)

In der Untersuchungsreihe wurden im Zeitraum von August 2005 bis Juni 2006 und Mai 2007 bis Juni 2007 151 Putenfleischproben sowie von März 2006 bis Juli 2006 93 Schweinefleischproben auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. überprüft. Da die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB keine Anweisung für die mikrobiologische Analytik von *Arcobacter* in Lebensmitteln enthält, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die in der Literatur von HOUF et al. (2001b) beschriebene kulturelle Nachweismethode verwendet. Die Kultivierung der Proben erfolgte über eine Selektivanreicherung und einem Selektivagar nach der unter 3.1.2 angegebenen Rezeptur. Anreicherung und Nachweismedium wurden bei 30 °C mikroaerophil für 48 Stunden bebrütet.

#### 4.1.1 Putenfleisch

Auf den Selektivplatten wuchsen die verdächtigen Keime als transparente, glatte und runde Kolonien, mit einem Durchmesser von < 2 mm (HOUF et al., 2001b). Dieses typische Wachstum konnte bei 121 der 151 (80,1 %) analysierten Proben beobachtet werden. Bei 103 der 121 positiven Proben zeigten sich die Platten ausschließlich mit Reinkulturen bewachsen, hingegen waren bei den restlichen 18 Proben die typischen Kolonien von fremder Keimflora begleitet. Die Begleitflora wuchs jedoch in so geringem Umfang, dass ein gutes Selektieren der verdächtigen Kolonien möglich war. Bei drei Proben erbrachten die Agarplatten nur ein Wachstum von Fremdkeimen. Ob hier wirklich keine *Arcobacter*-Kontamination vorlag oder ob das Wachstum von *Arcobacter* durch die konkurrierende Begleitflora gehemmt bzw. unterdrückt wurde, muss offen bleiben. Bei den übrigen 27 der 151 Proben waren auf den Nachweismedien keinerlei Kolonien zu erkennen.

Die verdächtigen Keime wurden mittels Oxidase-, Katalase- und Beweglichkeitstest sowie Gramfärbung weiter untersucht. Dabei zeigten sie sich Oxidase-positiv und im Katalasetest variabel. Es war zu beobachten, dass die Oxidase- und Katalasereaktionen der kleineren Kolonien (< 1 mm) stärker ausfielen. Die Vermutung, dass es sich bei diesen um *A. cryaerophilus*-Kolonien handelt, konnte molekularbiologisch bestätigt werden. Die Gramfärbung zeigte stets gramnegative Stäbchen.

Die aufgrund ihrer Morphologie und Stoffwechseleigenschaften verdächtigen Proben wurden mit Hilfe der PCR-Analyse überprüft und sämtlichst als *Arcobacter spp.* bestätigt. Bezogen auf die Artzugehörigkeit wurden 109 (72,2 %) Isolate als *A. butzleri*, fünf (3,3 %) als *A. cryaerophilus* und sieben (4,6 %) als *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* klassifiziert (Abbildung 4.1).

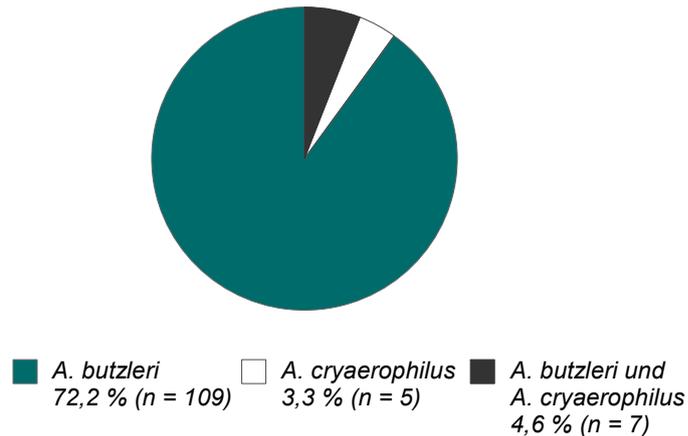


Abbildung 4.1: Nachweishäufigkeit von *Arcobacter spp.* in Putenfleisch (n = 151)

In der vorliegenden Studie waren am häufigsten Putenbrustfleisch (n = 50) und Putenkeulen (n = 39) einbezogen, gefolgt von Innereien (n = 26), Putenflügeln (n = 21), -bratwürsten (n = 5), -hackfleisch (n = 5), -kleinfleisch (n = 4) sowie eine Cevapcici-Probe. Die Prävalenzen sind in Tabelle 4.1. sowie Abbildung 4.2 zusammengestellt. In der Tabelle ist aufgeführt, wie

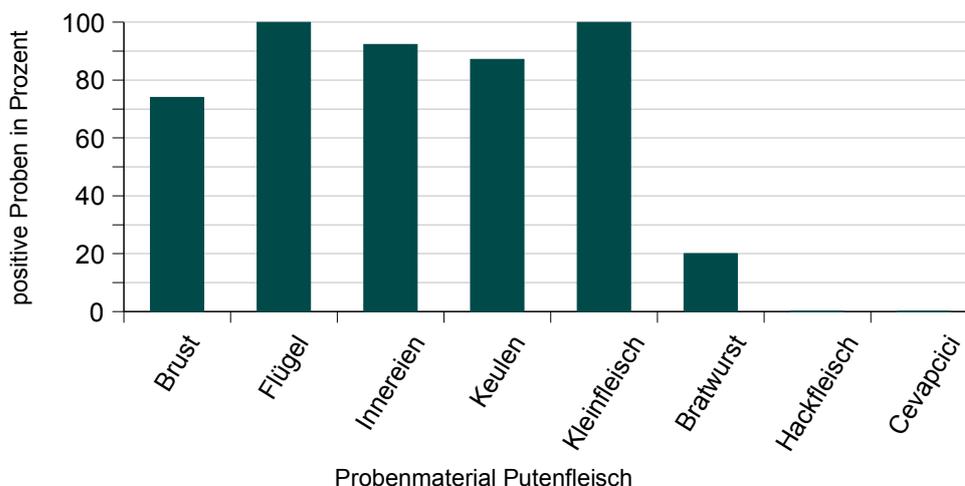


Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung der *Arcobacter*-positiven Proben auf die Putenfleischerzeugnisse

viele Proben jeweils genommen und welche Keime aus den Proben isoliert wurden.

Tabelle 4.1.: Vorkommen von *Arcobacter spp.* in den untersuchten Putenfleischproben (n = 151)

Probenart	Anzahl der Proben	Arcobacter-positiv		A. butzleri	A. cryaerophilus	A. butzleri + A. cryaerophilus
		Anzahl	Prozent (%)			
Putenbrust	50	37	74,0	30	5	2
Putenflügel	21	21	100,0	21	0	0
Puteninnereien	26:	24:	92,3:	23:	0	1:
• Herzen	7	7	100,0	6	0	1
• Leber	10	8	80,0	8	0	0
• Mägen	9	9	100,0	9	0	0
Putenkeulen	39:	34:	87,2:	30:	0	4:
• Oberkeulen	16	13	81,3	12	0	1
• Unterkeulen	23	21	91,3	18	0	3
Putenkleinfleisch (Hals, Flügel, Mägen)	4	4	100,0	4	0	0
Putenbratwurst	5	1	20,0	1	0	0
Putenhackfleisch	5	0	0,0	0	0	0
Cevapcici	1	0	0,0	0	0	0

Wie in der Tabelle 4.1. und der Abbildung 4.2 dargestellt, konnten aus dem Putenhackfleisch und der Cevapcici-Probe keine *Arcobacter spp.* detektiert werden. Die Putenbratwürste wiesen mit 20 % eine geringe *Arcobacter*-Belastung auf. Allerdings sind die Probenzahlen für eine repräsentative Aussage zu niedrig. Mit einer Isolierungsrate von 87,2 % für die Putenkeulen, 74 % für das Putenbrustfleisch und 80 % für die Putenlebern zeigten sich diese Matrices stark mit *Arcobacter* kontaminiert. Die höchste Nachweisrate mit 100 % konnte in den Putenflügeln, dem Putenkleinfleisch, den Putenherzen und den Putenmägen ermittelt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde in Putenfleisch eine hohe Prävalenz von *Arcobacter spp.* festgestellt, wobei die untersuchten Erreger in Muskelfleisch, Muskelfleisch mit Haut und Innereien gleich häufig auftraten. Die Resultate machen deutlich, dass dieses Lebensmittel ein bedeutendes Reservoir für die Vertreter der Gattung *Arcobacter spp.* darstellt.

In der Literatur finden sich zum Vorkommen von *Arcobacter spp.* in Putenfleisch unterschiedliche Angaben, denn es werden Nachweisraten zwischen 0 und 77,8 % angegeben. Eine Ursache könnte in der Verwendung unterschiedlicher kultureller Isolierungsverfahren begründet liegen. So konnten ZANETTI et al. (1996) in keiner der 30 analysierten Putenfleischwaren *Arcobacter spp.* nachweisen. Die Proben wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 37 °C in PRESTON-Anreicherungsbouillon und auf CCD-Agar kultiviert. Andere Arbeitsgruppen erhielten ähnlich niedrige Nachweisraten. OK ANADUT und GÜMÜŞSOY (2005) sowie AYDIN et al. (2007) untersuchten 50 bzw. 100 Putenfleischproben mittels *Arcobacter*-Anreicherungsbouillon (ATABAY und CORRY, 1998; mikroaerob, 30 °C) sowie Membranfiltrationstechnik auf Blutagar (aerob, 30 °C). Sie konnten nur in 4 % der untersuchten Proben *Arcobacter* detektieren. ATABAY et al. (2001) gelang es unter Verwendung einer *Campylobacter*-Anreicherungsbouillon supplementiert mit CAT (mikroaerob, 30 °C) und Kultivieren auf Filter-Blutagar (aerob, 30 °C), aus 24 % der Proben (n = 17) *Arcobacter* zu isolieren. LAMMERDING et al. (1996) fanden *Arcobacter* dagegen in sieben der neun (77,8 %) analysierten Putenfleischerzeugnisse. Für den Nachweis verwendeten sie *Arcobacter*-Anreicherungsbouillon (mikroaerob, 30 °C) kombiniert mit modifiziertem CCD-Nachweismedium (aerob, 30 °C). In der Erhebung von MANKE et al. (1998) erwiesen sich 303 (76,7 %) der 395 frisch maschinell zerlegten Putenfleischproben als *Arcobacter*-positiv. Aus 223 der 303 Proben ließ sich *A. butzleri* isolieren. Der kulturelle Nachweis gelang mit EMJH P-80-Anreicherung und anschließendem Überimpfen auf BHI-Agar mittels Filtrationstechnik (aerob, 30 °C).

Die mit der von HOUF et al. (2001b) vorgeschlagenen Nachweismethode durchgeführte Erhebung demonstriert, dass dieses Verfahren eine hohe Effektivität besitzt. Da sich zur Gegenüberstellung der Ausbeute der unterschiedlichen mikrobiologischen Isolierungsverfahren keine entsprechenden Ergebnisse finden und ein tatsächlicher methodischer Vergleich anhand einer verbundenen Stichprobe in der eigenen Arbeit nicht abgeleitet werden kann, fällt eine vergleichende Bewertung schwer. Festzustellen ist jedoch, dass mit Hilfe der von HOUF et al. beschriebenen Methode eine sehr hohe Isolierungsrate (80,1 %), einschließlich unterschiedlicher Spezies, erzielt werden konnte. Zudem gelang aufgrund der in den Selektivmedien verwendeten Substanzen sehr gut, die Begleitflora am Wachstum zu hemmen bzw. zu unterdrücken. Des Weiteren erwies sich die Herstellung der Medien sowie die Handhabung im Labor als sehr einfach und kostengünstig.

#### 4.1.2 Schweinefleisch

Auf dem Nachweismedium wachsen die *Arcobacter*-verdächtigen Keime als transparente, glatte und runde Kolonien, mit einem Durchmesser von < 2 mm (HOUF et al., 2001b). Diese typische Ausprägung konnte bei 45 der 93 (48,4 %) analysierten Proben beobachtet werden. Bei 43 dieser 45 Proben zeigten sich die Agarplatten ausschließlich mit Reinkulturen bewachsen. Die übrigen zwei Proben wiesen neben den typischen Kolonien zusätzlich eine fremde Keimflora auf, jedoch nur in geringem Umfang, weshalb ein gutes Selektieren der verdächtigen Keime gegeben war. Bei 22 der 93 untersuchten Proben fehlten charakteristische Kolonien auf den bewachsenen Platten. Ob diese Proben nicht mit *Arcobacter* belastet waren oder ob das Wachstum dieser Erreger durch konkurrierende Fremdkeime gehemmt bzw. unterdrückt wurde, ist offen. Bei den restlichen 26 der 93 untersuchten Schweinefleischproben war auf den Nachweismedien keinerlei Bewuchs zu finden.

Die verdächtigen Kolonien wurden mittels Oxidase-, Katalase- und Beweglichkeitstest sowie Gramfärbung überprüft. Es war zu beobachten, dass die Oxidase- und Katalasereaktionen der kleineren Kolonien (< 1 mm) stärker ausfielen. Bei diesen Erregern handelte es sich um *A. cryaerophilus*-Kolonien, wie molekularbiologisch verifiziert werden konnte. Die Gramfärbung zeigte gramnegative Stäbchen.

Von den 93 analysierten Schweinefleischproben wurden 45 (48,4 %) der verdächtigen Proben über PCR-Analyse als *Arcobacter*-positiv bestätigt, davon 37 (39,8 %) als *A. cryaerophilus* und acht (8,6 %) als *A. butzleri*. (Abbildung 4.3)

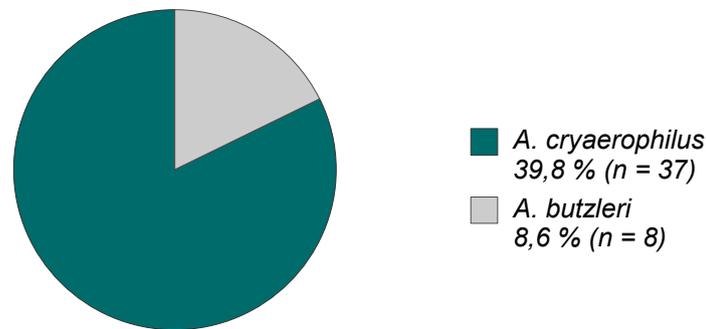


Abbildung 4.3: Nachweishäufigkeit von *Arcobacter* spp. in Schweinefleisch (n = 93)

Im Rahmen dieser Studie wurden am häufigsten Schweineinnereien (n = 20), Schweinefleisch vom Rücken (n = 15), Schweinefleischabschnitte (n = 14, Gulasch, Gehacktes, Schnitzel), Bauchfleisch (n = 12), und Schweinehaxen/Spitzbeine (n = 12), gefolgt von Brustfleisch (n = 6), Schwanz (n = 5), Schweinenacken (n = 4) und Keulen (n = 4) sowie Schweineohr (n = 1) auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. untersucht.

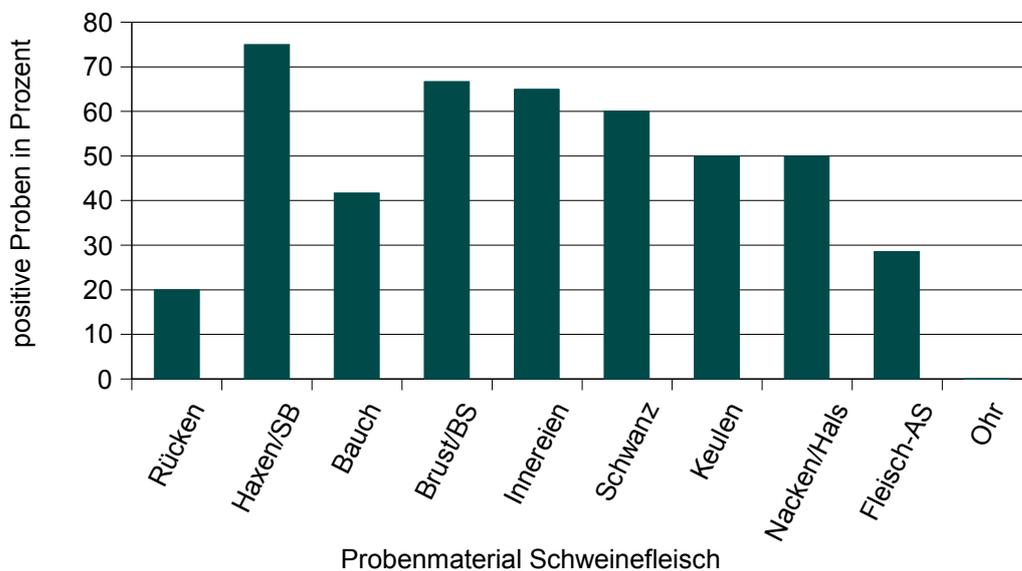


Abbildung 4.4: Prozentuale Verteilung der *Arcobacter*-positiven Proben auf die Schweinefleischerzeugnisse

Wie in Tabelle 4.2. und Abbildung 4.4 dargestellt, zeigten sich Hackfleisch- und Schweinerückenproben mit Kontaminationsraten von 14,3 und 20 % als gering belastet. Höhere Kontaminationsraten mit 25 bis 50 % wurden für die Fleischproben vom Bauch, der Nieren, der Leber, der Keulen und für Nackenproben ermittelt. Am häufigsten konnten *Arcobacter spp.* in den Schweineherzen (88,9 %) und Schweinehaxen/Spitzbeinen (75 %) detektiert werden, gefolgt vom Brustfleisch und den Gulaschproben (66,7 %). Von den fünf untersuchten Schweineschwänzen zeigten sich drei mit *Arcobacter* kontaminiert. Ebenso konnte aus der Lungengewebsprobe *A. butzleri* isoliert werden, wohingegen sich im Schweineohr kein *Arcobacter* nachweisen ließ. In Tabelle 4.2. sind die einzelnen Beprobungen und jeweiligen Ergebnisse zusammengestellt. Es ist aufgeführt, wie viele Proben jeweils genommen wurden und welche Keime isoliert werden konnten. Wegen der niedrigen Probenzahlen je Kontingent können die Unterschiede in den Prävalenzen nur Anhaltspunkte und keine gesicherten Trends wiedergeben.

Tabelle 4.2.: Vorkommen von *Arcobacter spp.* in Schweinefleisch (n = 93)

Probenart	Anzahl der Proben	<i>Arcobacter</i> -positiv		<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
		Anzahl	Prozent		
Schweinerücken	15	3	20,0	0	3
Schweinehaxen/ Spitzbein (SB)	12	9	75,0	1	8
Schweinebauch	12	5	41,7	1	4
Schweinebrust/ Brustspitze (BS)	6	4	66,7	0	4
Schweineinnereien	20:	13:	65,0:	2:	11:
• Herzen	9	8	88,9	1	7
• Leber	7	3	42,9	0	3
• Lunge	1	1	100,0	1	0
• Nieren	3	1	33,3	0	1
Schweineschwanz	5	3	60,0	1	2
Schweinekeule	4	2	50,0	1	1
Schweinenacken/ Hals	4	2	50,0	0	2
Fleischabschnitte (-AS)	14:	4:	28,6:	2:	2:
• Gulasch	3	2	66,7	1	1
• Hackfleisch/Mett	7	1	14,3	0	1
• Schnitzel	4	1	25,0	1	0
Schweineohr	1	0	0,0	0	0

Ebenso wie für Putenfleisch gibt es für Schweinefleisch und -erzeugnisse in der Literatur zu den *Arcobacter*-Kontaminationsraten - möglicherweise methodisch bedingt - stark divergierende Angaben (vgl. Tabelle 2.3.). Einige Autoren beschreiben Isolierungsraten zwischen 0 und 7 % (DE BOER et al., 1996; ZANETTI et al., 1996; KABEYA et al., 2004; KELLER et al., 2006). Andere Arbeitsgruppen geben Prävalenzen von 29 bis 68 % an (OHLENDORF und MURANO, 2002a; VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2003; RIVAS et al., 2004; SCULLION et al., 2006). COLLINS et al. (1996a) konnten sogar in bis zu 90 % ihrer untersuchten Proben den Erreger nachweisen. In einer aktuellen Arbeit von VAN DRIESSCHE und HOUF (2007), in der sowohl in einem Schlachtbetrieb Tupferproben von Vorderbein, Brust, Becken und Schinken als auch grob und fein gehacktes Schweinefleisch vom Metzger und aus Supermärkten auf *Arcobacter spp.* untersucht wurden, wurden 163 der 169 getesteten Schlachtkörper bzw. 23,8 % (5/21) und 19,2 % (5/26) der Lebensmittelproben als positiv beurteilt. Die Autoren ermittelten bei den Schlachtkörpern 24 Stunden nach Eviszation und einer Schlachtkörper-Kerntemperatur von 7 °C Isolierungsraten von 73,2 % für die Vorderläufe (52/71), 78,9 % für das Brustfleisch (56/71), 18,3 % für die Beckenfleischtupfer (13/71) und 31 % für die Schinkenfleischproben (22/71).

#### **4.1.3 Vergleich der Befunde in Puten- und Schweinefleisch sowie Verteilung der Spezies**

Ein Vergleich (Tabelle 4.3.) der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Kontaminationsraten von Puten- und Schweinefleisch zeigt, dass *Arcobacter spp.* häufiger aus den untersuchten Geflügelfleischproben isoliert werden konnte. Damit wurden die Ergebnisse vorhergehender Studien bestätigt. Des Weiteren weisen die beiden Lebensmittelmatrizes eine unterschiedliche Verteilung der nachgewiesenen *Arcobacter*-Spezies auf: Mit 72,2 % bildete im Putenfleisch *A. butzleri* die dominierende Spezies, gefolgt von *A. cryaerophilus* mit nur 3,3 %. Hingegen konnte im Schweinefleisch am häufigsten *A. cryaerophilus* (39,8 %), gefolgt von *A. butzleri* (8,6 %), detektiert werden. In bisherigen Untersuchungen über das Vorkommen von *Arcobacter* in Putenfleisch ließ sich einzig *A. butzleri* isolieren bzw. *Arcobacter spp.* (LAMMERDING et al., 1996; MANKE et al., 1998; ATABAY et al., 2001; OK ANADUT und GÜMÜŞSOY, 2005; AYDIN et al., 2007). Ergänzend kann angeführt werden, dass den Literaturangaben zufolge Hühner- und Broilerfleisch prozentual häufiger mit *A. butzleri*, gefolgt von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*, belastet war (ATABAY et al., 1998, 2003, 2006; HOUF et al., 2000, 2001b; KABEYA et al., 2004;

MORITA et al., 2004; RIVAS et al., 2004; SCULLION et al., 2004, 2006; SON et al., 2006).

Tabelle 4.3.: Überblick Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Puten- und Schweinefleisch

Lebensmittel	Anzahl der Proben	Anzahl (%) <i>Arcobacter</i> -positiver Proben	Anzahl (%) der positiven Proben für						
			Ab	Ac	As	Ab + Ac	Ab + As	Ac + As	Ab + Ac + As
<b>Pute</b>	151	121 (80,1)	109 (72,2)	5 (3,3)	0	7 (4,6)	0	0	0
<b>Schwein</b>	93	45 (48,4)	8 (8,6)	37 (39,8)	0	0	0	0	0

Ab = *Arcobacter butzleri*, Ac = *Arcobacter cryaerophilus*, As = *Arcobacter skirrowii*

Über das Vorkommen der verschiedenen *Arcobacter*-Spezies im Schweinefleisch gibt es nur sehr wenig bzw. unspezifisches Datenmaterial. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit isolierten VILLARRUEL-LÓPEZ et al. (2003) und KABEYA et al. (2004) aus Schweinehackfleisch hauptsächlich *A. butzleri*. VAN DRIESSCHE und HOUF (2007) detektierten in 10 (21,3 %) der 47 untersuchten Hackfleischproben *Arcobacter* spp., dabei handelte es sich bei sechs Proben um *A. butzleri*, bei drei um *A. cryaerophilus* und bei einer Probe um *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*. Sie konnten 26 *A. butzleri*- und acht *A. cryaerophilus*-Isolate differenzieren. Dagegen zeigte sich in einer weiteren Studie an 169 Schweineschlachtkörpern (vier Fleischbereiche pro Tier) *A. cryaerophilus* als dominierende Spezies, gefolgt von *A. skirrowii*, *A. butzleri*, Co-Kontamination von *A. cryaerophilus* mit *A. skirrowii* sowie *A. cryaerophilus* mit *A. butzleri*. Es wurden 824 *A. cryaerophilus*-, 25 *A. skirrowii*- und neun *A. butzleri*-Isolate identifiziert.

Die bisherigen Erhebungen machen deutlich, dass *Arcobacter* spp. bei Puten- und Schweinefleisch häufig vorkommen. Es handelt sich demnach um Matrices, die besonders anfällig für diesen Keim sind, Putenfleisch im Besonderen. Durch die hohe Prävalenz in diesen Lebensmitteln ist eine Aufnahme der Erreger durch den Verbraucher bei Rohverzehr oder Verzehr von unzureichend erhitztem Puten- und Schweinefleisch möglich. Auch eine Kontamination verzehrsfertiger Lebensmittel kann bei mangelnder Küchenhygiene stattfinden.

## 4.2 Vergleich kultureller Nachweisverfahren

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden drei kulturelle Isolierungsmethoden für den Nachweis von *Arcobacter spp.* in Putenfleisch vergleichend untersucht. Geprüft wurden die Verfahren nach HOUF et al. (2001b), nach JOHNSON und MURANO (1999a, b) sowie die modifizierte JOHNSON und MURANO-Methode nach SCULLION et al. (2004). In ihrer Arbeit haben SCULLION et al. (2004) die JOHNSON und MURANO-Methode dahingehend geändert, dass sie die Anreicherungen bereits nach 24 Stunden und nochmals nach der von JOHNSON und MURANO angegebenen 48-stündigen Inkubation auf den Selektivnährboden überimpften.

In der eigenen Studie wurden die von den Nachweismedien selektierten *Arcobacter*-verdächtigen Kolonien und die Selektivanreicherungen mit Hilfe der speziesspezifischen mPCR-Analyse nach HOUF et al. (2000) genotypisch geprüft.

### 4.2.1 HOUF et al. (2001b)

#### Isolierungsraten aus dem Anreicherungsmaterial mittels PCR-Analyse:

Von den 51 untersuchten Putenfleischproben konnte aus dem bebrüteten Anreicherungsmaterial (HOUF et al., 2001b) in 39 Proben *Arcobacter* nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Nachweisrate von 76,5 %. Bei der nachgewiesenen Spezies handelte es sich stets um *A. butzleri*.

#### Isolierungsraten von dem Nachweismedium und biochemische Untersuchung:

Von diesen im vorhergehenden Absatz erwähnten 39 positiven Anreicherungen zeigten sich nur in 34 Fällen verdächtige Kolonien auf den festen Selektivnährböden (HOUF et al., 2001b). Bei 23 der 34 *Arcobacter*-verdächtigen Proben erwiesen sich die Agarplatten ausschließlich mit Reinkulturen bewachsen. Hingegen waren bei den restlichen 11 Proben die typischen Kolonien von fremder Keimflora begleitet, allerdings in geringem Umfang, sodass ein gutes Selektieren der verdächtigen Keime möglich war. Letztere zeigten sich als ca. 1 bis 2 mm große, runde, glatte, erhabene, semitransluzente bis leicht gelbliche Kolonien.

Bei den verbleibenden fünf *Arcobacter*-positiven Anreicherungen waren die Nachweismedien

mit keinerlei Keimflora bewachsen. Diese fünf Proben wären somit als falsch negativ bewertet worden (9,8 %).

Isolierungsraten aus der BHI-Bouillon mittels PCR-Analyse:

Die 34 aufgrund der mikrobiologischen und biochemischen Untersuchung als *Arcobacter*-positiv beurteilten Kolonien wurden mit Hilfe der mPCR-Analyse überprüft. In 33 Fällen konnten die verdächtigen Keime als *A. butzleri* identifiziert werden, was einer Nachweisrate von 64,7 % (33/51) entspricht. Somit wurde eine Probe, bei der zwar in der Selektivanreicherung *A. butzleri* nachgewiesen werden konnte und sich mikrobiologisch und biochemisch ebenso *Arcobacter*-verdächtig zeigte, molekularbiologisch nicht als *Arcobacter*-positiv bestätigt.

Tabelle 4.4.: Isolierungsraten: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - Methode HOUF et al. (n = 51)

Anzahl positiver Proben PCR aus der Anreicherung	Anzahl Proben Bebrüten auf Selektivnährboden morphologische u. biochemische Untersuchung	Anzahl Proben PCR aus der BHI-Bouillon
39 <i>A. butzleri</i>	34 Verdacht auf <i>Arcobacter</i> spp. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 23 ohne Begleitflora</li> <li>▪ 11 geringe Begleitflora</li> </ul> 5 kein Wachstum	33 <i>A. butzleri</i> 1 negativ

**4.2.2 JOHNSON und MURANO (1999a, b)**

Isolierungsraten aus dem Anreicherungsmedium mittels PCR-Analyse:

Aus den Anreicherungen (JOHNSON und MURANO, 1999b) der 51 Putenfleischproben wurden in 45 Fällen (88,2 %) *Arcobacter* angezüchtet, dabei wurden in 40 Proben *A. butzleri* und in 5 Proben sowohl *A. butzleri* als auch *A. cryaerophilus* nachgewiesen.

Isolierungsraten von dem Nachweismedium und biochemische Untersuchung:

Bei der Begutachtung der festen Selektivnährböden (JOHNSON und MURANO, 1999a) konnte auf allen Agarplatten der 51 untersuchten Proben ein Keimwachstum beobachtet werden. Mit Hilfe der mikrobiologischen und biochemischen Auswertung wurden jedoch nur 24 der 51 Proben (47,1 %) als *Arcobacter*-verdächtig beurteilt. *Arcobacter*-Kolonien zeigten

das typische Wachstum: bis zu 2 mm große, runde, semitransluzente, gebrochen weiße bis graue, glatte und erhabene Kolonien. Bei sechs der 24 Proben wiesen die Agarplatten Reinkulturen auf. Bei den restlichen 18 Proben zeigte sich neben den charakteristisch gewachsenen *Arcobacter spp.* noch Begleitflora. Bei den verbleibenden 27 (52,9 %) der 51 untersuchten Putenfleischproben konnten aufgrund des starken Wachstums der Begleitflora keine *Arcobacter*-verdächtigen Kolonien von dem Nachweismedium selektiert werden.

Isolierungsraten aus der BHI-Bouillon mittels PCR-Analyse:

Die 24 aufgrund der mikrobiologischen und biochemischen Untersuchung als *Arcobacter*-positiv beurteilten Kolonien (47,1 %) wurden mit Hilfe der mPCR-Analyse bestätigt. Die Spezies-Verteilung lautete: 19 Proben *A. butzleri*, drei Proben *A. cryaerophilus*, zwei Proben Co-Kontamination von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*.

In 19 der 24 Proben stimmten die Ergebnisse der genotypischen Untersuchung der Anreicherungen mit den Ergebnissen der phänotypischen Charakterisierung und nachfolgenden molekularbiologischen Differenzierung der verdächtigen *Arcobacter*-Kolonien überein.

Tabelle 4.5.: Übereinstimmende Ergebnisse: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - JOHNSON-MURANO-Methode (n = 51)

Anzahl der Proben	PCR aus der Anreicherung	Bebrüten auf Selektivnährboden morphologische u. biochemische Untersuchung	PCR aus der BHI-Bouillon
18	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter spp.</i> mit/ohne Begleitflora	<i>A. butzleri</i>
1	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter spp.</i> mit Begleitflora	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>

Bei den anderen fünf Proben zeigten die Ergebnisse der drei Untersuchungsschritte keine 100 %ige Übereinstimmung. In Tabelle 4.6. sind die jeweiligen Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 4.6.: Diskrepante Proben: Anreicherung (PCR), Kultivieren, BHI (PCR) - JOHNSON-MURANO-Methode

Probe	PCR aus der Anreicherung	Bebrüten auf Selektivnährboden morphologische u. biochemische Untersuchung	PCR aus der BHI-Bouillon
1	<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter spp.</i> ohne Begleitflora	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>
2	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter spp.</i> mit Begleitflora	<i>A. cryaerophilus</i>
3	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter spp.</i> mit Begleitflora	<i>A. butzleri</i>
4	<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter spp.</i> mit Begleitflora	<i>A. cryaerophilus</i>
5	negativ	<i>Arcobacter spp.</i> mit Begleitflora	<i>A. cryaerophilus</i>

Bei den 27 Putenfleischproben, bei denen aufgrund des starken Wachstums der Begleitflora von den Agarplatten kein Selektieren typischer *Arcobacter*-Kolonien möglich war, ergab die molekularbiologische Überprüfung der Anreicherung, dass 22 Proben (43,1 %; 22/51) mit *Arcobacter* kontaminiert waren. Die Selektivmedien erwiesen sich als nicht wirksam genug, um das Wachstum von Fremdkeimen zu unterdrücken. Über das kulturelle Nachweisverfahren wären diese Proben als negativ beurteilt worden, was einem falsch negativen Resultat entspräche.

#### 4.2.3 JOHNSON und MURANO modifiziert nach SCULLION et al. (2004)

Im Rahmen einer Studie zum Vergleich kultureller Isolierungsmethoden für den Nachweis von *Arcobacter* in rohem Geflügelfleisch empfahlen SCULLION et al. (2004) eine Modifikation des Protokolls von JOHNSON und MURANO (1999a, b). Um eine Verbesserung der Effektivität des Nachweisverfahrens zu erreichen, wurde die

Selektivanreicherung nach 24 und 48 Stunden überimpft. Die Autoren erzielten mit diesem zusätzlichen Schritt eine Erhöhung der Nachweisrate von absolut 18 %: Mit Hilfe des Originalprotokolls lag die *Arcobacter*-Nachweisrate bei 50 % und mit dem modifizierten Protokoll bei 68 %.

Die eigene Untersuchung konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen, denn das Kultivieren nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Isolierungsrate. Es wurde lediglich eine Erhöhung von 47,1 auf 49 % beobachtet. Nach 24-stündiger Anreicherung zeigten sich nur zwei der 51 untersuchten Putenfleischproben als *Arcobacter*-positiv. Bei der nachgewiesenen Spezies handelte es sich um *A. butzleri*. Der Vergleich mit den Ergebnissen der JOHNSON und MURANO-Originalmethode (nur 48-stündige Inkubation der Anreicherung) zeigte bei einer der beiden positiven Proben eine Übereinstimmung. Die zweite positive Probe wäre mittels klassischer JOHNSON und MURANO-Methode als negativ und damit als falsch negativ beurteilt worden. Hier ist jedoch anzumerken, dass in der Selektivanreicherung der Originalmethode die molekularbiologische Untersuchung ebenso ein positives Ergebnis aufzeigte, gleichwohl vom festen Nährboden kein Nachweis verdächtiger Kolonien gegeben war.

#### Isolierungsraten aus dem Anreicherungsmaterial mittels PCR-Analyse:

In der molekularbiologischen Untersuchung der 24-stündigen Anreicherung erbrachten zwei der 51 Proben ein *Arcobacter*-positives Resultat. Die molekularbiologische Prüfung der 48-stündigen Anreicherung ergab für 45 Proben *Arcobacter*-positive Ergebnisse (Resultate wie bei der klassischen JOHNSON-MURANO-Methode unter Punkt 4.2.2 aufgeführt). Die falsch negativen Ergebnisse der 24-stündigen Anreicherung können in der verkürzten Inkubationszeit und der damit verbundenen niedrigen Keimzahl begründet liegen, die die Sensitivität der mPCR und somit das Erfassen der Erreger einschränkt.

#### Isolierungsraten auf dem Nachweismedium und biochemische Untersuchung:

Bei der Begutachtung der festen Selektivnährböden (JOHNSON und MURANO, 1999a) konnte bei 44 der 51 untersuchten Proben auf den Agarplatten ein Keimwachstum beobachtet werden. In der morphologischen und biochemischen Auswertung zeigten sich nur bei zwei der 44 Proben neben Fremdkeimen *Arcobacter*-verdächtige Kolonien. Bei den anderen 42 Proben war die Begleitflora so dominierend, dass ein Selektieren typischer Keime nicht möglich war. Die Nachweismedien der restlichen sieben der 51 Proben waren

mit keinerlei Keimflora bewachsen.

Isolierungsraten der BHI-Bouillon mittels PCR-Analyse:

Die beiden morphologisch und biochemisch verdächtigen Proben konnten mittels mPCR als *A. butzleri* bestätigt werden. Wie oben bereits erwähnt, wäre eine dieser beiden Proben über die Original-JOHNSON-MURANO-Methode nicht erfasst worden.

Tabelle 4.7. zeigt vergleichend die Untersuchungsergebnisse der drei Nachweisverfahren:

Tabelle 4.7.: Untersuchungsergebnisse der drei Nachweisverfahren

Nr.	HOUF et al.			Original JOHNSON und MURANO (48 h)			JOHNSON und MURANO (24 h)		
	PCR AR	MBU	PCR BHI	JOHNSON und MURANO modifiziert					
				PCR AR	MBU	PCR BHI	PCR AR	MBU	PCR BHI
1	B	typ. + BF	B	B	typ.	B	negativ	nur BF	/
2	B	typ. + BF	B	B	typ.	B + C	negativ	typ. + BF	B
3	B	typ.	B	B + C	typ. + BF	C	negativ	n. b.	/
4	B	typ.	B	B	typ.	B	negativ	n. b.	/
5	B	typ. + BF	B	B	typ.	B	negativ	nur BF	/
6	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
7	B	typ.	B	B	typ.	B	negativ	nur BF	/
8	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
9	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
10	B	typ.	B	B	typ.	B	negativ	nur BF	/
11	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
12	B	typ. + BF	B	B	typ. + BF	B	B	nur BF	/
13	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
14	B	typ. + BF	B	B + C	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
15	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
16	negativ	n. b.	/	negativ	nur BF	/	negativ	nur BF	/
17	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
18	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
19	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	typ. + BF	B
20	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
21	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	n. b.	/

## VERGLEICH KULTURELLER NACHWEISVERFAHREN

Nr.	HOUF et al.			Original JOHNSON und MURANO (48 h)			JOHNSON und MURANO (24 h)		
	JOHNSON und MURANO modifiziert								
	PCR AR	MBU	PCR BHI	PCR AR	MBU	PCR BHI	PCR AR	MBU	PCR BHI
22	B	typ.	B	negativ	nur BF	/	negativ	n. b.	/
23	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
24	B	typ. + BF	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
25	B	typ. + BF	B	B + C	nur BF	/	negativ	nur BF	/
26	negativ	n. b.	/	B	typ. + BF	B	B	nur BF	/
27	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
28	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
29	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
30	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
31	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
32	B	typ. + BF	B	B + C	typ. + BF	C	negativ	nur BF	/
33	B	n. b.	/	negativ	nur BF	/	negativ	nur BF	/
34	B	typ.	B	B + C	typ. + BF	a b B C	negativ	n. b.	/
35	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
36	B	typ.	B	negativ	nur BF	/	negativ	nur BF	/
37	B	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
38	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
39	negativ	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
40	B	typ.	B	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
41	negativ	n. b.	/	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
42	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
43	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
44	B	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
45	negativ	n. b.	/	negativ	nur BF	/	negativ	nur BF	/
46	B	typ.	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/
47	B	typ. + BF	B	B	typ. + BF	B	negativ	n. b.	/
48	B	n. b.	/	B	typ. + BF	B	negativ	n. b.	/
49	B	typ. + BF	negativ	negativ	typ. + BF	C	negativ	nur BF	/
50	B	n. b.	/	B	nur BF	/	negativ	nur BF	/
51	B	typ. + BF	B	B	typ. + BF	B	negativ	nur BF	/

AR = Anreicherung, BF = Begleitflora, B = *A. butzleri*, C = *A. cryaerophilus*, MBU = morphologische und biochemische Untersuchung, n. b. = Agar nicht bewachsen, typ. = typische *Arcobacter*-Kolonien

#### 4.2.4 Methodischer Vergleich und Eignung

Bei der vergleichenden Betrachtung der drei Isolierungsmethoden ist festzuhalten:

In der vorliegenden Studie erwies sich die Methode nach HOUF et al. (2001b; Methode 1) als überlegen, da mit ihr die höchste *Arcobacter*-Nachweisrate erzielt werden konnte. So wurde für dieses Verfahren ein Prozentsatz an Isolierungen von 64,7 % ermittelt. Im Vergleich dazu lagen die Nachweisraten für die originale (Methode 2) und die modifizierte JOHNSON und MURANO-Technik (Methode 3) nur bei 47,1 bzw. 49 %. SCULLION et al. (2004) erzielten hingegen mit der Methode nach HOUF et al. und der modifizierten JOHNSON und MURANO-Methode jeweils eine Nachweisrate von 68 %, während die JOHNSON und MURANO-Originalmethode nur 50 % *Arcobacter*-positive Proben erbrachte. In besagter Studie zeigte sich das feste Selektivmedium nach JOHNSON und MURANO stärker mit Fremdkeimen bewachsen als das nach HOUF et al., was sich in der eigenen Arbeit bestätigte. Die selektiven Substanzen der Medien nach HOUF et al. hemmen das Wachstum der konkurrierenden Begleitflora offenbar effektiver. Bei 23 der mit Hilfe dieser Methode untersuchten Proben zeigten sich die Agarplatten nicht mit Fremdkeimen bewachsen, dagegen waren es bei Methode 2 bzw. 3 jeweils nur sechs Proben. Des Weiteren erwies sich die Methode 1 in der Durchführung einfacher, übersichtlicher und kostengünstiger.

Tabelle 4.8.: Nachweishäufigkeit von *Arcobacter spp.* in *Putenfleisch* im Vergleich HOUF et al., JOHNSON-MURANO, JOHNSON-MURANO modifiziert

Isolierungsmethode	Anzahl (%) <i>Arcobacter</i> -positiver Proben (n = 51)	Anzahl positiver Proben für						
		Ab	Ac	As	Ab + Ac	Ab + As	Ac + As	Ab + Ac + As
HOUF et al. (2001b)	33 (64,7)	33	0	0	0	0	0	0
JOHNSON und MURANO (1999a, b)	24 (47,1)	19	3	0	2	0	0	0
JOHNSON und MURANO modifiziert (SCULLION et al., 2004)	25 (49,0)	20	3	0	2	0	0	0

Ab = *Arcobacter butzleri*, Ac = *Arcobacter cryaerophilus*, As = *Arcobacter skirrowii*

24 h Anreicherung      48 h Anreicherung

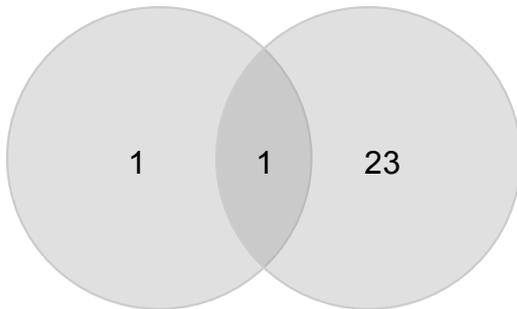


Abbildung 4.5: Verteilung positiver Proben nach JOHNSON-MURANO modifiziert

HOUF et al.      JOHNSON-MURANO

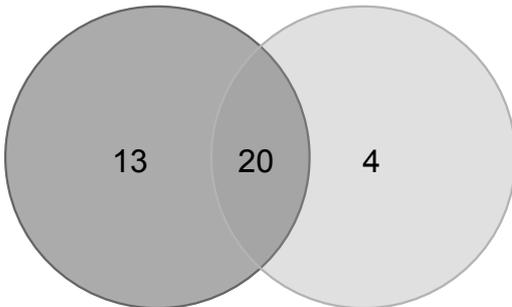


Abbildung 4.6: Verteilung positiver Proben nach HOUF et al. und JOHNSON-MURANO

HOUF et al.      JOHNSON-MURANO modifiziert

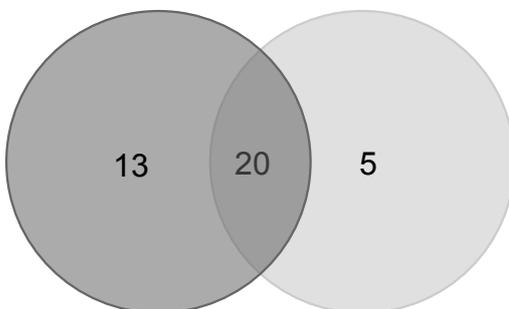


Abbildung 4.7: Verteilung positiver Proben nach HOUF et al. und JOHNSON-MURANO modifiziert

Das zusätzliche Ausstreichen der Selektivanreicherung nach 24 Stunden (Methode 3) brachte im Vergleich zu dem einmaligen Ausstreichen der Anreicherung nach 48 Stunden Inkubation (Methode 2) keine deutlich höhere Nachweishäufigkeit. Dieser zusätzliche Schritt führte lediglich zu einer Erhöhung von 1,9 % (= 1 Probe), sodass die Modifizierung als entbehrlich betrachtet werden kann. Die erhobenen Daten stehen im Gegensatz zu den von SCULLION et al. (2004) ermittelten.

Im Vergleich zu den Methoden 2 und 3 gelang mit Hilfe der Methode 1 die beste Ausbeute positiver Proben. Die Analyse der Nachweiskraten der drei Untersuchungsverfahren zeigte jedoch bei der Verteilung der positiven Proben keine 100 %ige Übereinstimmung. Das Verwenden von nur einer Nachweismethode hätte weniger positive Proben und damit eine geringe Nachweisrate erbracht. Aus den Abbildungen 4.6 und 4.7 ist zu entnehmen, dass bei 20 Proben die positiven Resultate der Methode 1, 2 und 3 identisch waren, also dieselben Proben als positiv identifiziert wurden, während es sich bei den anderen positiven Ergebnissen um verschiedene Proben handelte: 13 weitere positive Proben mit Hilfe der Methode 1 sowie 4 bzw. 5 weitere positive Proben mittels Methode 2 bzw. 3. Das heißt, bei alleinigem Einsatz wären die Proben der betreffenden zweiten Nachweismethode nicht erfasst

worden. Weiterhin zeigten die drei Verfahren hinsichtlich der nachgewiesenen *Arcobacter*-Spezies Unterschiede. So wurde mit der Methode 1 nur *A. butzleri* nachgewiesen, während mit Hilfe der Methoden 2 bzw. 3. auch *A. cryaerophilus* detektiert werden konnte. Allerdings zeigen Literaturquellen sowie die vorherige eigene Untersuchung (Teil 1 dieser Arbeit, Punkt 4.1), dass sich Methode 1 durchaus für den Nachweis von *A. cryaerophilus* aus Lebensmitteln eignet (HOUF et al., 2001b; SCULLION et al., 2004; VAN DRIESSCHE und HOUF, 2007). Beispielsweise isolierten SCULLION et al. (2004) in ihrer vergleichenden Studie mit Hilfe der Methode 1 *A. cryaerophilus* - gleichwohl mit einer geringeren Nachweisrate (1/50) als mit dem JOHNSON-MURANO-Verfahren (3/50). In derselben Erhebung konnte auch mittels der JOHNSON-MURANO-Methode *A. skirrowii* (1/50) detektiert werden. Über Isolierungsschwierigkeiten von *A. cryaerophilus* - und besonders von *A. skirrowii* - wird diskutiert. Vergleichende Aussagen sind insoweit schwierig, weil auch in langfristigen Studien Verschiebungen hinsichtlich der Keimarten sowie intermittierende Ausscheidungen der Spezies vorkamen (HUME et al., 2001; HO et al., 2006a).

In bisherigen Studien erwies sich die JOHNSON-MURANO-Methode als eine geeignete Nachweismethode. So ermittelten VILLARRUEL-LOPEZ et al. (2003) Nachweisraten von 40 % für Hühnerfleisch, 51,1 % für Schweinefleisch und 28,9 % für Rindfleisch. JOHNSON und MURANO (1999b) detektierten sogar 84 % *Arcobacter*-positive Hähnchenfleischproben. Obwohl MORITA et al. (2004) und GONZÁLEZ et al. (2000) in ihren Studien mit Hilfe der DE BOER- bzw. COLLINS-Methode (AB mit CAT - nach COLLINS et al., 1996a) *Arcobacter* aus 48 bzw. 53 % der Proben isolieren konnten, zeigte sich in einer Vergleichsstudie die JOHNSON-MURANO-Methode als überlegen. Entsprechendes gilt für eine Erhebung von GOLLA et al. (2002) an gesunden Rindern und Milchkühen. Mit Hilfe der JOHNSON-MURANO-Methode konnte relativ schnell eine höhere *Arcobacter*-Nachweisrate als mit der gleichzeitig getesteten COLLINS-Methode (EMJH-P80-Bouillon und CVA-Agar) erreicht werden. OHLENDORF und MURANO (2002a) untersuchten 200 Schweinehackfleischproben auf das Vorkommen von *Arcobacter spp.* und verwendeten die COLLINS-, die DE BOER- (*Arcobacter*-Selektivbouillon und -selektivmedium) und die JOHNSON-MURANO-Methode. Letztgenanntes Verfahren wurde als das am besten geeignete bewertet, denn es ließen sich bis zu 68 % *Arcobacter*-positive Proben nachweisen. Zudem beurteilten die Autoren die Methode in ihrer Durchführung als einfach und wenig zeitaufwändig. In einer ergänzenden Studie überprüften sie die Sensitivität dieser drei Verfahren. Dabei konnte die höchste Sensitivität für die JOHNSON-MURANO-Methode beobachtet werden: Bis zu einer

Konzentration von  $10^1$  CFU/g war *A. butzleri* bei 100 % und *A. cryaerophilus* bei 75 % der untersuchten Schweinehackfleischproben nachzuweisen (OHLENDORF und MURANO, 2002b).

In verschiedenen Vergleichsstudien wurde festgestellt, dass es bei der Verteilung positiver Proben der verschiedenen mikrobiologischen Isolierungsverfahren geringe Überschneidungszahlen gibt. Somit zeigte sich keines der getesteten kulturellen Nachweismethoden für den alleinigen Gebrauch als geeignet. Zur Verbesserung und Optimierung der Isolierungsrate dieser anspruchsvollen Keime sowie des Nachweises einer möglichen Vielzahl von unterschiedlich empfindlicher Serovare, wird in der Literatur empfohlen, zwei unterschiedliche Nachweisverfahren einzusetzen (COLLINS et al., 1996a; ATABAY und CORRY, 1997; OHLENDORF und MURANO, 2002a; SCULLION et al., 2004). Die eigenen Daten können diese Beobachtung bekräftigen, wie die Abbildungen 4.5, 4.6 und 4.7 ausweisen. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich das Verfahren nach HOUF et al. (2001b) als eine sehr selektive und geeignete Isolierungsmethode. Mit ihr konnte die beste Nachweisrate erzielt werden, bei fast optimaler Unterdrückung der Begleitflora. Zudem ist es in der Durchführung relativ einfach sowie zeit- und kostengünstig. Obwohl sich die JOHNSON-MURANO-Verfahren in der Durchführung, besonders bei der Herstellung der Medien, als aufwändig erwies und die verwendeten Selektivsubstanzen nur schlecht das Wachstum der konkurrierenden Keime unterdrückten, war es doch des sehr charakteristischen Wachstums von *Arcobacter* wegen möglich, verdächtige Keime von dem Nachweismedium zu isolieren und mit Hilfe dieses Verfahrens zwar nicht die meisten positiven Proben zu erhalten, aber die meisten Spezies nachzuweisen. Das modifizierte JOHNSON-MURANO-Protokoll zeigte sich von allen drei Verfahren in der Durchführung als sehr umständlich und brachte im Vergleich zum Originalprotokoll keine markante Erhöhung der Nachweisrate. Der Einsatz dieser Methode scheint daher als fragwürdig und wenig sinnvoll.

Die vergleichende Analyse der ermittelten positiven Proben der Methode nach HOUF et al. (2001b) und Methode nach JOHNSON und MURANO (1999a, b) zeigte, dass sich mit einem kombinierten Einsatz die Nachweishäufigkeit und Anzahl verschiedener Isolate erhöhen lässt. Der parallele Einsatz dieser mikrobiologischen Untersuchungsmethoden ist somit zu empfehlen, wie es auch bei anderen Erregern, so zum Beispiel *Salmonella spp.*, üblich ist.

## 5 Schlussfolgerung

- Mit der von HOUF et al. (2000, 2001b) vorgeschlagenen Untersuchungsmethode konnte in 80,1 % der rohen Putenfleischproben und in 48,4 % der rohen Schweinefleischproben *Arcobacter spp.* detektiert werden. Dominierende Spezies im Putenfleisch war *A. butzleri*, gefolgt von *A. cryaerophilus*. Hingegen wurde im Schweinefleisch am häufigsten *A. cryaerophilus* nachgewiesen, gefolgt von *A. butzleri*. Die hohen Isolierungsraten, vor allem im Geflügelfleisch, zeigen, dass diese Lebensmittel besonders anfällig für eine Kontamination mit diesem Erreger sind. Damit stellen sie eine mögliche Infektionsgefahr für den Verbraucher dar und bilden ein nicht zu vernachlässigendes Risiko. Da zum jetzigen Zeitpunkt das tatsächlich pathogene Potenzial und die Virulenz dieses Keimes nicht geklärt sind, sollten, um eine Kontamination der Lebensmittel bzw. Kreuzkontamination anderer Lebensmittel zu verhüten, die allgemeinen Hygienemaßnahmen eingehalten werden. Insbesondere zählen dazu ausreichendes Garen des Fleisches und gründliche Reinigung im Küchenbereich sowie der Hände.
- In der Vergleichsstudie von drei Untersuchungsmethoden war hinsichtlich der Nachweisrate eine deutliche Überlegenheit des von HOUF et al. (2001b) beschriebenen Nachweisprotokolls gegenüber dem originalen (1999a, b) und modifizierten (SCULLION et al., 2004) JOHNSON-MURANO-Verfahren zu beobachten. Des Weiteren erwies sich die Herstellung der Medien sowie die Handhabung im Labor als einfacher und kostengünstiger.
- Zwischen der Produktivität der von JOHNSON und MURANO (1999a, b) entwickelten Isolierungsmethode und der von SCULLION et al. (2004) modifizierten JOHNSON-MURANO-Methode bestand kein wesentlicher Unterschied in der Nachweisrate. Das in der modifizierten Version vorgeschlagene zeitlich abgestufte zweimalige Überimpfen der Anreicherungsbouillon führte lediglich zu einem zusätzlichen positiven Nachweis und damit zu keiner entscheidenden Verbesserung der Isolierungsquote.
- Die Analyse der Ergebnisse der drei Untersuchungsmethoden zeigte, dass es keine 100 %ige Übereinstimmung in der Verteilung positiver Proben gab. Der Vergleich der ermittelten Kontaminationsraten macht deutlich, dass sich durch das Kombinieren der Nachweismethoden eine markante Verbesserung der Isolierungsraten erbringen lässt. Weil das modifizierte JOHNSON-MURANO-Protokoll gegenüber dem Original-

JOHNSON-MURANO-Protokoll keinen bedeutenden Anstieg der *Arcobacter*-positiven Proben erbrachte und sich in der Handhabung als aufwändiger erwies, wird die Kombination der Nachweisprotokolle nach HOUF et al. und JOHNSON-MURANO empfohlen.

## 6 Zusammenfassung

### **Prävalenz von *Arcobacter spp.* in Puten- und Schweinefleisch aus dem Berliner Einzelhandel und Vergleich von drei kulturellen *Arcobacter*-Nachweisverfahren**

Bei *Arcobacter* handelt es sich um ein recht unbekanntes Bakterium. Es wurde Ende der siebziger Jahre aus Rinder- und Schweineföten isoliert und seit dem als potentiell pathogener Keim im Lebensmittelbereich eingestuft. Verschiedene Lebensmittelinfektionen durch *Arcobacter spp.* wurden beschrieben, jedoch sind die Kontaminationsquellen bisher nicht bekannt, was unter anderem in den unzureichenden Isolierungsverfahren begründet liegt.

In der internationalen Literatur wurden für den kulturellen Nachweis von *Arcobacter spp.* verschiedene Untersuchungsmethoden vorgeschlagen, ohne dass sich ein standardisiertes Referenzverfahren gemäß der amtlichen Methode nach § 64 Lebensmittel-Futtermittel-Gesetzbuch (LFGB), vormals § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz (LMBG) oder der International Organization for Standardization (ISO) entwickelte. Dieser Umstand erschwert eine hinreichende Klärung und Bewertung von *Arcobacter spp.* bezüglich des Vorkommens, der Virulenz und Pathogenese und damit des Risikos für den Verbraucher.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kontaminationsrate von *Arcobacter spp.* für frisches Puten- und Schweinefleisch aus dem Berliner Filial- und Einzelhandel festzustellen. Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an das von HOUF et al. (2000, 2001b) entwickelte mikro- und molekularbiologische Protokoll (Methode1). In einer ergänzenden Studie sollte die mikrobiologische Untersuchungsmethode von HOUF et al. (2001b) mit dem von JOHNSON und MURANO (1999a, b) vorgeschlagenen Protokoll (Methode 2) und dem von SCULLION et al. (2004) modifizierten JOHNSON-MURANO-Protokoll (Methode 3) kritisch verglichen und hinsichtlich ihrer Effizienzen geprüft werden. Die Erhebungen fanden im Zeitraum von August 2005 und Juni 2007 statt und umfassten insgesamt 244 Fleischproben: 151 Proben stammten von rohem Putenfleisch/-Innereien und 93 Proben von rohem Schweinefleisch/-Innereien.

Es ergaben sich folgende Isolierungsraten:

Von den 151 Putenfleischproben waren 121 (80,1 %) mit *Arcobacter* kontaminiert. Es

wurden aus 72,2 % der Proben *A. butzleri*, aus 3,3 % *A. cryaerophilus* und aus 4,6 % *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* zugleich isoliert. Bei den Schweinefleischproben zeigten sich 45 der 93 Proben (48,4 %) mit *Arcobacter spp.* belastet. In 39,8 % der Fälle wurde *A. cryaerophilus* und in 8,6 % *A. butzleri* nachgewiesen.

Dass die analysierten rohen Puten- und Schweinefleischproben häufig mit *Arcobacter spp.* belastet waren, wobei der Anteil kontaminierten Putenfleisches höher lag, stützen bisherige Studien und Einschätzungen, in denen Geflügelfleisch für den Menschen als eine potentielle Hauptinfektionsquelle von *Arcobacter spp.* bewertet wird. Obgleich sich das Schweinefleisch nicht so hoch belastet zeigte, kommt dem Erreger auch in diesem Nahrungsmittel eine große Bedeutung zu. *Arcobacter spp.* wurde von der ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) der Gruppe der "emerging food pathogens" zugeteilt, sodass für den Verbraucher aufgrund der Aufnahme von *Arcobacter*-kontaminiertem Schweine- und Putenfleisch bzw. Kreuzkontamination bei der Zubereitung anderer Lebensmittel ein Infektionsrisiko zu vermuten ist. Unzureichende Küchenhygiene sowie ungenügendes Erhitzen des Fleisches stellen dabei eine nicht zu vernachlässigende Gefahrenquelle dar. Um diesen Infektionsweg zu unterbrechen, müssen die allgemein bekannten Maßnahmen der Lebensmittel- und Küchenhygiene eingehalten werden.

In der vergleichenden Untersuchung zur Produktivität der drei kulturellen Nachweisverfahren gelang die beste Ausbeute mit Hilfe der Methode 1: Insgesamt konnten 64,7 % positive Proben registriert werden, im Gegensatz zu 47,1 % bei Methode 2 bzw. 49 % bei der sehr ähnlichen Methode 3. Die von HOUF et al. (2001b) vorgeschlagenen Selektivsubstanzen hemmten bzw. unterdrückten fast vollständig das Wachstum konkurrierender Begleitflora. Hingegen zeigte sich das feste Nährmedium nach der von JOHNSON und MURANO (1999a) angegebenen Rezeptur teilweise sehr stark mit Fremdkeimen bewachsen. In 88,2 % der 51 analysierten Proben entwickelte sich eine Begleitflora auf den Agarplatten. Aufgrund des charakteristischen Wachstums von *Arcobacter* konnten dennoch in 35,3 % der Fälle die verdächtigen Kolonien gut selektiert werden. Bei den restlichen 52,9 % war dies nicht möglich; Ursprünglich vorhandene geringste Kontaminationen können in manchen Fällen durch die Begleitflora überwuchert oder durch Substrateinflüsse inaktiviert worden sein, sodass sie dadurch dem Nachweis entgingen. Des Weiteren zeigte sich die Methode 1 im Vergleich zu den beiden anderen Untersuchungsverfahren in der Herstellung der Medien sowie der Handhabung im Labor als einfacher und kostengünstiger.

Obwohl in der vorliegenden Studie die Überlegenheit der Methode 1 gegenüber den beiden anderen Verfahren demonstriert werden konnte, zeigte die Analyse der Ergebnisse der drei Untersuchungsmethoden in der Verteilung der positiven Proben und nachgewiesenen Spezies keine 100 %ige Übereinstimmung. In 39,2 % (20/51) der untersuchten Proben waren die positiven Resultate der Methode 1, 2 und 3 identisch, das heißt, es wurden dieselben Proben als positiv identifiziert, während es sich bei 33,3 % (17 Proben; Vergleich Methode 1 und 2) bzw. 35,3 % (18 Proben, Vergleich Methode 1 und 3) der als positiv ermittelten Proben um verschiedene handelte. Der Befund macht deutlich, dass bei Einsatz von nur einer Nachweismethode zu viele Proben als falsch negative Resultate auftreten. Durch den kombinierten Einsatz verschiedener Untersuchungsmethoden lässt sich deshalb eine deutliche qualitative und quantitative Verbesserung des Isolierungsergebnisses erzielen. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde von verschiedenen Autoren der Einsatz unterschiedlicher Methodenkombinationen befürwortet. Weil das modifizierte JOHNSON-MURANO-Protokoll gegenüber der originalen JOHNSON-MURANO-Anweisung zu keinem wesentlichen Anstieg der Isolierungsrate führte und sich in der Handhabung als aufwändiger erwies, ist aufgrund der erhobenen Daten eine Kombination der Nachweisprotokolle nach HOUF et al. (2001b) und JOHNSON-MURANO (1999a, b) zu empfehlen.

Der gegenwärtige Kenntnisstand über Epidemiologie, Pathogenese und Virulenz von *Arcobacter spp.* ist noch recht unzureichend, sodass die Bedeutung als humanpathogenes Agens und als Erreger, der via Nahrungsmittel übertragen wird, nicht zuverlässig beurteilt werden kann. Neben einem standardisierten Isolationsverfahren zum Nachweis von *Arcobacter* benötigt es weitere Studien, um seinen tatsächlichen Einfluss bei Erkrankungen des Menschen zu klären. Solange aber die Rolle von *Arcobacter spp.* unklar bleibt, ist nach dem Vorsorgeprinzip Vorsicht angezeigt.

## 7 Summary

### **Prevalence of *Arcobacter* spp. in turkey meat and pork from Berlin retail handlers and a comparison of three cultural *Arcobacter* detection methods**

*Arcobacter* concerns a relatively unknown bacterium. The bacterium was isolated from cattle at the end of the 1970's and since then, it has been classified as a potentially pathogenic germ in the food sector. Different food infections caused by *Arcobacter* spp. have been described, however the sources of contamination still remain not well-known, which may lie among other things in insufficient isolation procedures.

In the international literature available, different research methods for the cultural detection of *Arcobacter* spp. have been suggested, without a standardized reference procedure developed in accordance with the official method following § 64 Lebensmittel-Futtermittel-Gesetzbuch (LFGB), former § 35 Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) or the International Organization for Standardization (ISO). This circumstance makes a sufficient clarification and evaluation of *Arcobacter* spp. more difficult in regards to its occurrence, virulence and pathogenesis, and thus the risk to the consumer.

The aim of the presented work was to determine the contamination rate of *Arcobacter* spp. for fresh turkey meat and pork from various retail and branch outlets in Berlin. The investigation was carried out in accordance to the micro- and molecular-biological methods (Method 1) described by HOUF et al. (2000, 2001b). In a supplementary study, the aforementioned microbiological research method from HOUF et al. (2001b), the recommended protocol from JOHNSON and MURANO (1999a, b - Method 2) and the modified version of the JOHNSON-MURANO protocol from SCULLION et al. (2004 - Method 3), were compared and examined in regards to their efficiency. Sampling occurred during the period of August 2005 and June 2007 and resulted in a total of 244 meat samples: 151 samples originated from raw turkey meat/innards and 93 samples from raw pork/innards.

The following isolation rates were observed:

From the 151 turkey samples, 121 (80,1 %) were contaminated with *Arcobacter*. From 72,2 % of the samples *A. butzleri* was isolated, from 3,3 % *A. cryaerophilus*, and from 4,6 % *A. butzleri* and *A. cryaerophilus* simultaneously. With the pork samples, 45 of the 93 samples

(48,4 %) were observed to be contaminated with *Arcobacter spp.* In 39,8 % of the cases, *A. cryaerophilus* was identified, whereas *A. butzleri* was detected in 8,6 %.

The microbiological investigation showed that the analysed raw turkey and pork samples were heavily contaminated with *Arcobacter spp.*, whereby the number of contaminated turkey meat was observed to be higher. These results support previous studies and estimates, in that poultry remains a potential source of the main origin of infection of *Arcobacter spp.* Although pork was not observed to be as highly contaminated, this agent also inheres a great deal of importance in this foodstuff. *Arcobacter spp.* has been assigned to the group "emerging food pathogens" by the ICMSF (international Commission on Microbiological Specifications for Foods), in that a risk of infection for the consumer exists due to the consumption of *Arcobacter* contaminated pork and turkey and/or cross contamination in the preparation of other foodstuffs. Insufficient kitchen hygiene as well as insufficient heating of the meat thereby does not represent a source of danger which can be neglected. In order to interrupt this route of infection, the generally well-known measures of food and kitchen hygiene must be adhered to.

In the comparative investigation of the productivity of the three isolation methods, the best yield was attained with the help of Method 1: A total of 64,7 % of positive samples could be classified, in contrast to the 47,1 % observed with Method 2 and respectively, 49 % with the very similar Method 3. The selected substances suggested by HOUF et al. (2001b) restrained and respectively suppressed almost completely the growth of the competitive concomitant flora. However, the selective agar developed by JOHNSON and MURANO (1999a), partly demonstrated very strong contamination with nonarcobacter flora. In 88,2 % of the 51 analysed samples, a accompanying flora was observed to have grown on the agar plates. Due to the characteristic growth of *Arcobacter*, 35,3 % of cases of suspicious colonies could be well selected. With the remaining 52,9 %, this was not possible; originally existing slight contaminations can in some cases be overgrown via the accompanying flora or can be inactivated by substrate influences, in that they evade detection. Furthermore, in comparison to the other two isolation methods, Method 1 was demonstrated to be easier and cheaper in the production of the medium as well as its application in the laboratory.

Although in the present study the superiority of Method 1 could be demonstrated in comparison to the other two methods, analysis of the results of the three detection methods

did not show a 100 % agreement in the distribution of the positive samples and detected species. In 39,2 % (20/51) of the analysed samples, the positive results were identical for all of the three methods used, that is, the same samples were identified as positive, whereas with 33,3 % (17 samples; comparison between Methods 1 and 2) and respectively 35,3 % (18 samples, comparison between Methods 1 and 3) of the positively determined samples, it involved different samples. The findings make clear that with the employment of only one detection method, many samples will give false-negative results. Through the combinative application of various detection methods, a clear qualitative and quantitative improvement of the isolation results can thus be obtained. In agreement with these findings, the employment of different combinations of methods has been endorsed by different authors. As the modified protocol of JOHNSON-MURANO compared with the original JOHNSON-MURANO instruction did not increase the isolation rate substantially and proved itself to be more complex in its handling, this is the reason why it is recommended that the collected data comprise of a combination of the isolation protocols following HOUF et al. (2001b) and JOHNSON-MURANO (1999a, b).

The present level of knowledge over epidemiology, pathogenesis and virulence of *Arcobacter spp.* remains quite insufficient, in that its relevance as a human-pathogenic agent and as a pathogen, which is transferred via food, can not be reliably assessed. Besides a standardised isolation method for the detection of *Arcobacter spp.*, further studies are required in order to clarify its real influence on human infections. As long as the role of *Arcobacter spp.* remains unclear, according to the precautionary principle, caution is required.

**8 Literaturverzeichnis**

- ABDELBAQI, K., V. PROUZET-MAULEON, A. MENARD und F. MEGRAUD (2005)  
In: Presented at the 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Gold Coast, Australia (Congress)
- ABDELBAQI, K., A. MÉNARD, V. PROUZET-MAULEON, F. BRINGAUD, P. LEHOURS und F. MÉGRAUD (2007)  
Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates  
FEMS Immunology & Medical Microbiology, 49, 337 - 345
- ANDERSON, K. F., J. A. KIEHLBAUCH, D. C. ANDERSON, H. M. McCLURE, I. K. WACHSMUTH (1993)  
*Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population  
Infection Immunity, 61, 2220 - 2223
- ANTOLÍN, A., I. GONZÁLEZ, T. GARCÍA, P. E. HERNÁNDEZ und R. MARTÍN (2001)  
*Arcobacter* spp. enumeration in poultry meat using a combined PCR-ELISA assay  
Meat Science, 59, 169 - 174
- ASPINALL, S. T., D. R. A. WAREING, P. G. HAYWARD und D. N. HUTCHINSON (1993)  
Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*  
Journal of Clinical Pathology, 46, 829 - 831
- ASSANTA, M. A., D. ROY, M.-J. LEMAY und D. MONTPETIT (2002)  
Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces  
Journal of Food Protection, 65, 1240 - 1247
- ATABAY, H. I. und J. E. L. CORRY (1997)  
The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens  
Journal of Applied Microbiology, 83, 619 - 625
- ATABAY, H. I. und J. E. L. CORRY (1998)  
Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for the enrichment of *Campylobacter* spp.  
International Journal of Food Microbiology, 41, 53 - 58
- ATABAY, H. I., J. E. L. CORRY und S. L. W. ON (1998)  
Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens  
Journal of Applied Microbiology, 84, 1007 - 1016
- ATABAY, H. I., M. WAINØ und M. MADSEN (2001)  
Comparison of PCR and conventional isolation methods for detection of arcobacters in Danish poultry. Identification of isolates using multiplex-PCR and phenotypic tests  
International Journal of Medical Microbiology, 291 (S31), 139 - 140

- ATABAY, H. I. und F. AYDIN (2001)  
Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents  
Letter in Applied Microbiology, 33, 430 - 433
- ATABAY, H. I., D. D. BANG, F. AYDIN, H. M. ERDOGAN und M. MADSEN (2002)  
Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting  
Letters in Applied Microbiology, 35, 141 - 145
- ATABAY, H. I., F. AYDIN, K. HOUF, M. SAHIN und P. VANDAMME (2003)  
The prevalence of *Arcobacter spp.* on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE  
International Journal of Food Microbiology, 81, 21 - 28
- ATABAY, H. I., M. WAINØ und M. MADSEN (2006)  
Detection and diversity of various *Arcobacter species* in Danish poultry  
International Journal of Food Microbiology, 109, 139 - 145
- AYDIN, F., K. S. GÜMÜŞSOY, H. I. ATABAY, T. IÇA und S. ABAY (2007)  
Prevalence and distribution of *Arcobacter species* in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR  
Journal of Applied Microbiology, 103, 27 - 35
- BASTYNS, K., D. CARTUYVELS, S. CHAPELLE, P. VANDAMME, H. GOOSSENS und R. DE WACHTER (1995)  
A variable 23S rDNA region is a useful discriminating target for genus-specific and species-specific PCR amplification in *Arcobacter species*  
Systematic and Applied Microbiology, 18, 353 - 356
- BRIGHTWELL G., E. MOWAT, R. CLEMENS, J. BOEREMA, D. J. PULFORD und S. L. ON (2007)  
Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* und *Arcobacter cryaerophilus*  
Journal of Microbiological Methods, 68, 318 - 325
- CARBONE, M., T. L. MAUGERI, M. GIANNONE, C. GUGLIANDOLO, A. MIDIRI und M. T. FERA (2003)  
Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio spp.* isolates to epithelial cells in vitro  
Food Microbiology, 20, 611 - 616
- CARNEIRO DE MELO, A. M. S., C. A. CASSAR und R. J. MILES (1998)  
Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin  
Journal of Food Protection, 61, 839 - 844
- ČERVENKA, L., I. ZACHOVÁ, P. MINAŘÍKOVÁ und J. VYTRÁSOVÁ (2003)  
Effect of pH and water activity on the growth of *Arcobacter sp.* in culture  
Czech Journal of Food Sciences, 21, 203 - 209

- ČERVENKA, L., Z. MALÍKOVÁ, I. ZACHOVÁ und J. VYTRÁSOVÁ (2004)  
The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture  
*Folia Microbiology*, 49, 8 - 12
- ČERVENKA, L. (2007)  
Survival and Inactivation of *Arcobacter spp.*, a current status and future prospect  
*Critical Reviews in Microbiology*, 33, 101 - 108
- COLLINS, C. I., I. V. WESLEY und E. A. MURANO (1996a)  
Detection of *Arcobacter spp.* in ground pork by modified plating methods  
*Journal of Food Protection*, 59, 448 - 452
- COLLINS, C. I., E. A. MURANO und I. V. WESLEY (1996b)  
Survival of *Arcobacter butzleri* and *Campylobacter jejuni* after irradiation treatment in vacuum-packaged ground pork  
*Journal of Food Protection*, 59, 1164 - 1166
- CORRY, J. E. L. und H. I. ATABAY (1997)  
Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*  
*International Journal of Food Microbiology*, 38, 201 - 209
- DE BOER, E., J. J. H. C. TILBURG, D. L. WOODWARD, H. LIOR, und W. M. JOHNSON (1996)  
A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats  
*Letters in Applied Microbiology*, 23, 64 - 66
- DE OLIVEIRA, S. J., A. L. BAETZ, I. V. WESLEY und K. M. HARMON (1997)  
Classification of *Arcobacter species* isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil  
*Veterinary Microbiology*, 57, 347 - 354
- DE OLIVEIRA, S. J., I. V. WESLEY, A. L. BAETZ, K. M. HARMON, I. T. A. KADER und M. DE UZEDA (1999)  
*Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil  
*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 462 - 464
- DIERGAARDT, S. M., S. N. VENTER, A. SPREETH, J. THERON und V. S. BROZEL (2004)  
The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa  
*Water Research*, 38, 2589 - 2595
- DONACHIE, S. P., J. P. BOWMAN, S. L. W. ON und M. ALAM (2005)  
*Arcobacter halophilus sp. nov.*, the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*  
*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1271 - 1277

- D'SA, E. M. und M. A. HARRISON (2005)  
Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp.  
Journal of Food Protection, 68, 18 - 25
- EIFERT, J. D., R. M. CASTLE, F. W. PIERSON, C. T. LARSEN und C. R. HACKNEY (2003)  
Comparison of sampling techniques for detection of *Arcobacter butzleri* from chickens  
Poultry Science, 82, 1898 - 1902
- ELLIS, W. A., S. D. NEILL, J. J. O'BRIEN, H. W. FERGUSON und J. HANNA (1977)  
Isolation of spirillum/vibrio-like organisms from bovine fetuses  
Veterinary Record, 100, 451 - 452
- ELLIS, W. A., S. D. NEILL, J. J. O'BRIEN und J. HANNA (1978)  
Isolation of spirillum-like organisms from pig fetuses  
Veterinary Record, 102, 106
- FERA, M. T., T. L. MAUGERI, M. GIANNONE, C. GUGLIANDOLO, E. LA CAMERA, G. BLANDINO und M. CARBONE (2003)  
In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents  
International Journal of Antimicrobial Agents, 21, 488 - 491
- FERA, M. T., T. L. MAUGERI, C. GUGLIANDOLO, C. BENINATI, M. GIANNONE, E. LA CAMERA und M. CARBONE (2004)  
Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea  
Applied and Environmental Microbiology, 70, 1271 - 1276
- FERNÁNDEZ, H., G. ELLER, J. PAILLACAR, T. GAJARDO und A. RIQUELME (1995)  
Toxicogenic and invasive capacities: Possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 90, 633 - 634
- GARRITY, G. M., J. A. BELL und T. LILBURN (2005)  
Class V. *Epsilonproteobacteria* class. nov., vol. 2 (The *Proteobacteria*), Teil C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by D. J. BRENNER, N. R. KRIEG, J. T. STALEY und G. M. GARRITY, New York: Springer
- GOLLA, S. C., E. A. MURANO, L. G. JOHNSON, N. C. TIPTON, E. A. CUREINGTON und J. W. SAVELL (2002)  
Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods  
Journal of Food Protection, 65, 1849 - 1853
- GONZÁLEZ, I., T. CARCÍA, A. ANTOLÍN, P. E. HERNÁNDEZ und R. MARTÍN (2000)  
Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat  
Letters in Applied Microbiology, 30, 207 - 212

- GONZÁLEZ, A., Y. MORENO, R. GONZÁLEZ, J. HERNÁNDEZ und A. FERRÚS (2006)  
Development of a simple and rapid method based on Polymerase Chain Reaction-  
Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to differentiate  
*Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter species*  
Current Microbiology, 53, 416 - 421
- HARMON, K. M. und I. V. WESLEY (1996)  
Identification of *Arcobacter* isolates by PCR  
Letters in Applied Microbiology, 23, 241 - 244
- HARMON, K. M. und I. V. WESLEY (1997)  
Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter*  
*butzleri* from other arcobacters  
Veterinary Microbiology, 58, 215 - 227
- HARRASS, B., S. SCHWARZ und S. WENZEL (1998)  
Identification of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial  
resistance patterns and plasmid analysis  
Journal of Veterinary Medicine-Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B, 45, 87 - 94
- HIGGINS, R., S. MESSIER, D. DAIGNAULT und M. LORANGE (1999)  
*Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate  
Laboratory Animals, 33, 87 - 90
- HILTON, C. L., B. M. MACKEY, A. J. HARGREAVES und S. J. FORSYTHE (2001)  
The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature  
treatments  
Journal of Applied Microbiology, 91, 929 - 932
- HO, H. T. K., L. J. A. LIPMAN, L. VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, M. VAN BERGEN und  
W. GAASTRA (2006a)  
Potential routes of acquisition of *Arcobacter species* by piglets  
Veterinary Microbiology, 114, 122 - 133
- HO, H. T. K., L. J. A. LIPMAN und W. GAASTRA (2006b)  
*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!  
Veterinary Microbiology, 115, 1 - 13
- HOOPER, D. C. (1998)  
Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance  
Clinical Infectious Diseases, 27 (Suppl 1), S 54 - 63
- HOUF, K., A. TUTENEL, L. DE ZUTTER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2000)  
Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and  
identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*  
FEMS Microbiology Letters, 193, 89 - 94

- HOUF, K., L. A. DEVRIESE, L. DE ZUTTER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2001a)  
Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media  
Journal of Clinical Microbiology, 39, 1654 - 1656
- HOUF, K., L. A. DEVRIESE, L. DE ZUTTER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2001b)  
Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter species* from poultry products  
International Journal of Food Microbiology, 71, 189 - 196
- HOUF, K., L. DE ZUTTER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2002a)  
Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods  
Applied and Environmental Microbiology, 68, 2172 - 2178
- HOUF, K., L. DE ZUTTER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2002b)  
Occurrence and distribution of *Arcobacter species* in poultry processing  
Journal of Food Protection, 65, 1233 - 1239
- HOUF, K., L. DE ZUTTER, B. VERBEKE, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2003)  
Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse  
Journal of Food Protection, 66, 364 - 369
- HOUF, K., L. A. DEVRIESE, F. HAESBROUCK, O. VANDENBERG, J.-P. BUTZLER, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2004)  
Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers  
Microbial Drug Resistance, 10, 243 - 247
- HOUF, K., S. L. W. ON, T. COENYE, J. MAST, J. VAN HOOFF und P. VANDAMME (2005)  
*Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 713 - 717
- HSUEH, P.-R., L.-J. TENG, P.-C. YANG, S.-K. WANG, S.-C. CHANG, S.-W. HO, W.-C. HSIEH und K.-T. LUH (1997)  
Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B  
Journal of Clinical Microbiology, 35, 489 - 491
- HUME, M. E., R. B. HARVEY, L. H. STANKER, R. E. DROLESKEY, T.L. POOLE und H. Z. ZHANG (2001)  
Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility  
Journal of Food Protection, 64, 645 - 651
- JACOB, J., H. LIOR und I. FEUERPFEIL (1993)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in Eastern Germany  
Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, 193, 557 - 562

- JACOB, J., D. WOODWARD, I. FEUERPFEIL und W. M. JOHNSON (1998)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany  
Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, 201, 189 - 198
- JOHNSON, L. G. und E. A. MURANO (1999a)  
Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter spp.*  
Journal of Food Protection, 62, 456 - 462
- JOHNSON, L. G. und E. A. MURANO (1999b)  
Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry  
Journal of Food Protection, 62, 610 - 614
- JOHNSON, L. G. und E. A. MURANO (2002)  
Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* Isolates from various sources  
Journal of Food Protection, 65, 1789 - 1795
- KABEYA, H., Y. KOBAYASHI, S. MARUYAMA und T. MIKAMI (2003a)  
One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter species*  
International Journal of Food Microbiology, 81, 163 - 168
- KABEYA, H., S. MARUYAMA, Y. MORITA, M. KUBO, K. YAMAMOTO, S. ARAI, T. IZUMI, Y. KOBAYASHI, Y. KATSUBE und T. MIKAMI (2003b)  
Distribution of *Arcobacter species* among livestock in Japan  
Veterinary Microbiology, 93, 153 - 158
- KABEYA, H., S. MARUYAMA, Y. MORITA, T. OHSUGA, S. OZAWA, Y. KOBAYASHI, M. ABE, Y. KATSUBE und T. MIKAMI (2004)  
Prevalence of *Arcobacter species* in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan  
International Journal of Food Microbiology, 90, 303 - 308
- KELLER, S., S. RÄBER, T. TASARA und R. STEPHAN (2006)  
Prevalence of *Arcobacter butzleri* in fecal samples, on carcasses and in retail meat of cattle, pig and poultry in Switzerland  
Archiv für Lebensmittelhygiene, 57, 64 - 68
- KIEHLBAUCH, J. A., D. J. BRENNER, M. A. NICHOLSON, C. N. BAKER, C. M. PATTON, A. G. STEIGERWALT und I. K. WACHSMUTH (1991a)  
*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness  
Journal of Clinical Microbiology, 29, 376 - 385
- KIEHLBAUCH, J. A., B. D. PLYKAYTIS, B. SWAMINATHAN, D. N. CAMERON und I. K. WACHSMUTH (1991b)  
Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Ribosomal Genes for Species Identification and Subtyping of Aerotolerant *Campylobacter species*  
Journal of Clinical Microbiology, 29, 1670 - 1676.

- KIEHLBAUCH, J. A., C. N. BAKER und I. K. WACHSMUTH (1992)  
In vitro susceptibilities of aerotolerant *Campylobacter* isolates to 22 antimicrobial agents  
*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 717 - 722
- LAMMERDING, A. M., J. E. HARRIS, H. LIOR, D. E. WOODWARD, L. COLE und C. A. MUCKLE (1996)  
Isolation method for recovery of *Arcobacter butzleri* from fresh poultry and poultry products  
In *Campylobacter VIII. Proceedings of the 8th International Workshop on Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms*, edited by NEWELL et al. Plenum Press, New York, 329 - 333
- LAU, A. K. P., P. C. Y. WOO, J. L. L. TENG, K. W. LEUNG und K. Y. YUEN (2002)  
Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis  
*Journal of Clinical Pathology: Mol. Pathol.*, 55, 182 - 185
- LERNER, J., V. BRUMBERGER und V. PREAC-MURSIC (1994)  
Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*  
*European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 660 - 662
- LONG, C. und C. A. PHILLIPS (2003)  
The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken  
*Food Microbiology*, 20, 495 - 502
- LOGAN, E. F., S. D. NEILL und D. P. MACKIE (1982)  
Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*  
*The Veterinary Record*, 110, 229 - 230
- MANKE, T. R., I. V. WESLEY, J. S. DICKSON und K. M. HARMON (1998)  
Prevalence and genetic variability of *Arcobacter species* in mechanically separated turkey  
*Journal of Food Protection*, 61, 1623 - 1628
- MARSHALL, S. M., P. L. MELITO, D. L. WOODWARD, W. M. JOHNSON, F. G. RODGERS und M. R. MULVEY (1999)  
Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction length fragment polymorphism analysis of the 16s rRNA gene  
*Journal of Clinical Microbiology*, 37, 4158 - 4160
- MAUGERI, T. L., C. GUGLIANDOLO, M. CARBONE, D. CACCAMO und M. T. FERA (2000)  
Isolation of *Arcobacter spp.* from a brackish environment  
*Microbiologica*, 23, 143 - 149
- MAXWELL, A. (1997)  
DNA gyrase as a drug target  
*Trends Microbiology*, 5, 102 - 109

- McCLUNG, C. R., D. G. PATRIQUIN und R. E. DAVIS (1983)  
*Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel  
International Journal of Systematic Bacteriology, 33, 605 - 612
- MORENO, Y., S. Botella, J. L. ALONSO, M. A. FERRÚS, M. HERNÁNDEZ und J. HERNÁNDEZ (2003)  
Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization  
Applied and Environmental Microbiology, 69, 1181 - 1186
- MORENO, Y., J. L. ALONSO, S. BOTELLA, M. A. FERRÚS und J. HERNÁNDEZ (2004)  
Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water  
Research in Microbiology, 155, 726 - 730
- MORITA, Y., S. MARUYAMA, H. KABEYA, S. BOONMAR, B. NIMSUPHAN, A. NAGAI, K. KOZAWA, T. NAKAJIMA, T. MIKAMI und H. KIMURA (2004)  
Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand  
Microbiology and Immunology, 48, 527 - 533
- MULLIS, K. B., F. A. FALOONA, S. J. SCHARF, R. K. SAIKI, G. T. HORN und H. A. EHRlich (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction  
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 51, 263 - 273
- MUSMANNO, R. A., M. RUSSI, H. LIOR und N. FIGURA (1997)  
In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples  
Microbiologica, 20, 63 - 68
- NEILL, S. D., W. A. ELLIS und J. J. O'BRIEN (1979)  
Designation of aerotolerant *Campylobacter*-like organisms from porcine and bovine abortions to the genus *Campylobacter*  
Research in Veterinary Science, 27, 180 - 186
- NEILL, S. D., J. J. O'BRIEN und W. A. ELLIS (1980)  
The isolation of aerotolerant *Campylobacter*  
The Veterinary Record, 106, 152 - 153
- NEILL, S. D., J. N. CAMPBELL, J. J. O'BRIEN, S. T. C. WEATHERUP und W. A. ELLIS (1985)  
The taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov.  
International Journal of Systematic Bacteriology, 35, 342 - 356
- ÖNGÖR, H., B. ÇETINKAYA, M. N. AÇIK und H. I. ATABAY (2004)  
Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey  
Letters in Applied Microbiology, 38, 339 - 344

- OHLENDORF, D. S. und E. A. MURANO (2002a)  
Prevalence of *Arcobacter spp.* in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods  
Journal of Food Protection, 65, 1700 - 1705
- OHLENDORF, D. S. und E. A. MURANO (2002b)  
Sensitivity of three methods used in the isolation of *Arcobacter spp.* in raw ground pork  
Journal of Food Protection, 65, 1784 - 1788
- OK ANADUT, F. und K. S. GÜMÜŞSOY (2005)  
Isolation of *Arcobacter spp.* from poultry carcasses put on consumption in Kayseri Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 14, 125 - 131
- ON, S. L. W., A. STACEY und J. SMYTH (1995)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia  
Journal of Infection, 31, 225 - 227
- ON, S. L. W., B. HOLMES und M. J. SACKIN (1996)  
A probability matrix for the identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa  
The Journal of Applied Bacteriology, 81, 425 - 432.
- ON, S. L. W., T. K. JENSEN, V. BILLE-HANSEN, S. E. JORSAL und P. VANDAMME (2002)  
Prevalence and diversity of *Arcobacter spp.* isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark  
Veterinary Microbiology, 85, 159 - 167
- ON, S. L. W., C. S. HARRINGTON und H. I. ATABAY (2003)  
Differentiation of *Arcobacter species* by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces  
Journal of Applied Microbiology, 95, 1096 - 1105
- OTTH, L., M. WILSON, R. CANCINO und H. FERNÁNDEZ (2004)  
In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* to six antimicrobial drugs  
Archivos de Medicina Veterinaria, 36, 207 - 210
- OTTH, L., G. SOLÍS, M. WILSON und H. FERNÁNDEZ (2005)  
Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to heavy metals  
Brazilian Journal of Microbiology, 36, 286 - 288
- PARK, S. (2005)  
*Campylobacter*: stress response and resistance  
In: M. Griffiths, ed. Understanding pathogen behaviour, 279 - 308, Cambridge: Woodhead
- PHILLIPS, C. A. (1999)  
The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*  
Letters in Applied Microbiology, 29, 424 - 428

- PHILLIPS, C. A. und J. DUGGAN (2001)  
The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture  
Food Microbiology, 18, 547 - 554
- PHILLIPS, C. A. und J. DUGGAN (2002)  
The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture  
Food Control, 12, 463 - 468
- PHILLIPS, C. A. und BATES, P. (2004)  
The survival of *Arcobacter butzleri*, an emerging human pathogen, in the presence of acids or ethanol  
Nutrition & Food Science, 34, 210 - 215
- PROUZET-MAULÉON, V., L. LABADI, N. BOUGES, A. MÉNARD und F. MÉGRAUD (2006)  
*Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen  
Emerging Infectious Diseases, 12, 307- 309
- PUGINA, P., G. BENZI, S. LAUWERS, R. VAN ETTERIJCK, J.-P. BUTZLER, L. VLAES und P. VANDAMME (1991)  
An outbreak of "*Arcobacter (Campylobacter) butzleri*" in Italy  
Microbial Ecology in Health and Disease, 4 (Suppl.), S 94
- RESNIK, S. L. und J. CHIRIFE (1988)  
Proposed theoretical literature values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth  
Journal of Food Protection, 51, 419 - 423
- RICE, E. W., M. R. RODGERS, I. V. WESLEY, C. H. JOHNSON und S. A. TANNER (1999)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water  
Letters in Applied Microbiology, 28, 31 - 35
- RIVAS, L., N. FEGAN und P. VANDERLINDE (2004)  
Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat  
International Journal of Food Microbiology, 91, 31 - 41
- ROHDER, A., J. KLEER und G. HILDEBRANDT (2007)  
Using microbiological analysis by JOHNSON & MURANO and multiplex PCR by HARMON & WESLEY for the identification of *Arcobacter spp.* in fresh poultry and minced beef sold in retail markets in Berlin  
Archiv für Lebensmittelhygiene, 58, 188 - 191
- ROMERO, J., M. GARCÍA-VARELA, J. P. LACLETTE und R. T. ESPEJO (2002)  
Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter spp.* constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*)  
Microbial Ecology, 44, 365 - 371

- ROSEF, O. (1981)  
Isolation of *Campylobacter fetus* susp. *jejuni* from the gall bladder of normal slaughter pigs, using an enrichment procedure  
*Acta Veterinaria Scandinavica*, 22, 149 - 151
- SCHROEDER-TUCKER, L., I. V. WESLEY, J. A. KIEHLBAUCH, D. J. LARSON, L. A. THOMAS und G. A. ERICKSON (1996)  
Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses  
*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 142 - 148
- SCULLION, R., C. S. HARRINGTON und R. H. MADDEN (2004)  
A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland  
*Journal of Food Protection*, 67, 799 - 804
- SCULLION, R., C. S. HARRINGTON und R. H. MADDEN (2006)  
Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland  
*Journal of Food Protection*, 69, 1986 - 1990
- SON, I., M. D. ENGLER, M. E. BERRANG, P. J. FEDORKA-CRAY und M. A. HARRISON (2006)  
Genetic diversity of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing  
*Journal of Food Protection*, 69, 1028 - 1033
- SON, I., M. D. ENGLER, M. E. BERRANG, P. J. FEDORKA-CRAY und M. A. HARRISON (2007)  
Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses  
*International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 451 - 455
- SPROCKHOFF, H. (1979)  
Die Überlebensfähigkeit bestimmter Krankheitserreger unter Umwelteinflüssen  
*Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 86, 33-36
- STAMPI, S., G. DE LUCA, O. VAROLI und F. ZANETTI (1999)  
Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacters* and *Arcobacter* in sewage sludge  
*Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, 202, 19 - 27
- STEELE, T. W. und S. N. McDERMOTT (1984)  
The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces  
*Pathology*, 16, 263 - 265
- TAYLOR, D. N., J. A. KIEHLBAUCH, W. TEE, C. PITARANGSI und P. ECHEVERRIA (1991)  
Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea  
*The Journal of infectious diseases*, 163, 1062 - 1067

- TEE, W., R. BAIRD, M. DYALL-SMITH und B. DWYER (1988)  
*Campylobacter cryaerophila* isolated from a human  
Journal of Clinical Microbiology, 26, 2469 - 2473
- THOMPSON, L. M. III, R. M. SMIBERT, J. L. JOHNSON und N. R. KRIEG (1988)  
Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*  
International Journal of Systematic Bacteriology, 38, 190 - 200
- TSANG, R. S., J. M. LUK, D. L. WOODWARD und W. M. JOHNSON (1996)  
Immunochemical characterization of a haemagglutinating antigen of *Arcobacter* spp.  
FEMS Microbiology Letters, 136, 209 - 213
- VANDAMME, P., B. POT, E. FALSEN, K. KERSTERS und J. DE LEY (1990)  
Intra- and interspecific relationships of veterinary campylobacters and revealed by  
numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations  
Systematic and Applied Microbiology, 13, 295 - 303
- VANDAMME, P., E. FALSEN, R. ROSSAU, B. HOSTE, P. SEGERS, R. TYTGAT und J. DE  
LEY (1991)  
Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of  
generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov.  
International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 88 - 103
- VANDAMME, P. und J. DE LEY (1991)  
Proposal for a new family, *Campylobacteriaceae*  
International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 451 - 455
- VANDAMME, P., M. M. VANCANNEYT, B. POT, L. MELS, B. HOSTE, D. DEWETTINCK, L.  
VLAES, C. VAN DEN BURRE, R. HIGGENS, J. HOMMEZ, K. KERSTERS, J. - P.  
BUTZLER und H. GOOSSENS (1992a)  
Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter*  
*butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium  
isolated from veterinary specimens  
International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 344 - 356
- VANDAMME, P., P. PUGINA, G. BENZI, R. VANETTERIJCK, L. VLAES, K. KESTERS, J. P.  
BUTZLER, H. LIOR und S. LAUWERS (1992b)  
Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an  
Italian school  
Journal of Clinical Microbiology, 30, 2335 - 2337
- VANDAMME, P. (2000)  
TAXONOMY of the Family *Campylobacteraceae*  
In: I. NACHAMKIN und M. J. BLASER (Eds.), *Campylobacter*. 2 ed. American Society  
for Microbiology, Washinton, DC, 3 - 26
- VANDENBERG, O., A. DEDISTE, K. HOUF, S. IBEKWEM, H. SOUAYAH, S. CADRANEL,  
N. DOUAT, G. ZISSIS, J.-P. BUTZLER und P. VANDAMME (2004)  
*Arcobacter* species in humans  
Emerging Infectious Diseases, 10, 1863 - 1867

- VANDENBERG, O., K. HOUF, N. DOUAT, L. VLAES, P. RETORE, J.-P. BUTZLER und A. DEDISTE (2006)  
Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 908 - 913
- VAN DRIESSCHE, E., K. HOUF, J. VAN HOOFF, L. DE ZUTTER und P. VANDAMME (2003)  
Isolation of *Arcobacter species* from animal faeces  
FEMS Microbiology Letters, 229, 243 - 248
- VAN DRIESSCHE, E., K. HOUF, F. VANGROENWEGHE, N. NOLLET, L. DE ZUTTER, P. VANDAMME und J. VAN HOOFF (2004)  
Occurrence and strain diversity of *Arcobacter species* isolated from healthy Belgian pigs  
Research in Microbiology, 155, 662 - 666
- VAN DRIESSCHE, E., K. HOUF, F. VANGROENWEGHE, L. DE ZUTTER und J. VAN HOOFF (2005)  
Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter species* in the faeces of healthy cattle in Belgium  
Veterinary Microbiology, 105, 149 - 154
- VAN DRIESSCHE, E. und K. HOUF (2007)  
Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork  
International Journal of Food Microbiology, 118, 20 - 26
- VILLARRUEL-LÓPEZ, A., M. MÁRQUEZ-GONZÁLEZ, L. E. GARAY-MARTÍNEZ, H. ZEPEDA, A. CASTILLO, L. MOTA DE LA GARZA, E. A. MURANO und R. TORRES-VITELA (2003)  
Isolation of *Arcobacter spp.* from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells  
Journal of Food Protection, 66, 1374 - 1378
- WESLEY, I. V., A. L. BAETZ und D. J. LARSON (1996)  
Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*  
Infection and Immunity, 64, 2295 - 2299
- WESLEY, I. V. und A. L. BAETZ (1999)  
Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry  
Poultry Science, 78, 536 - 545
- WESLEY, I. V., S. J. WELLS, K. M. HARMON, A. GREEN, L. SCHROEDER-TUCKER-TUCKER, M. GLOVER und I. SIDDIQUE (2000)  
Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter spp.* in dairy cattle  
Applied and Environmental Microbiology, 66, 1994 - 2000

- WINTERS, D. K. und M. F. SLAVIK (2000)  
Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products  
Molecular and Cellular Probes, 14, 95 - 99
- WOO, P. C. Y., K. T. K. CHONG, K.-W. LEUNG, T.-I. QUE und K.-Y. YUEN (2001)  
Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing  
Diagnostic Microbiology and Infection Disease, 40, 125 - 127
- WYBO, I., J. BREYNAERT, F. LINDENBURG, K. HOUF und S. LAUWERS (2004)  
Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea  
Journal of Clinical Microbiology, 42, 1851 - 1852
- YAN, J. J., W. C. KO, A. H. HUANG, H. M. CHEN, Y. T. JIN und J. J. WU (2000)  
*Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis  
Journal of the Formosan Medical Association, 99, 166 - 169
- ZANETTI, F., O. VAROLI, S. STAMPI und G. DE LUCA (1996)  
Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin  
International Journal of Food Microbiology, 33, 315 - 321

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Hildebrandt, der als wissenschaftlicher Leiter des Instituts für Lebensmittelhygiene der Universität Berlin meine Arbeit über den gesamten Zeitraum unterstützt und gefördert hat und mir im Rahmen meiner Projektstätigkeit den notwendigen Freiraum zur Entwicklung und Reifung der Dissertation gewährte.

Herrn Dr. J. Kleer danke ich für die immer währende Hilfe bei fachlichen Fragen. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr und stand mit Rat zur Seite.

Zu tiefst zu Dank verpflichtet bin ich Anja Hartl für die Aufmunterung und den Antrieb, die Doktorarbeit fertig zu stellen. An die schöne Zeit mit ihr werde ich mich immer mit Zuneigung und Freude im Herzen erinnern.

Danke Diana Köhler für viel Spaß und Lachen.

Die direkte und indirekte Unterstützung durch die Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Lebensmittelhygiene möchte ich nicht unerwähnt lassen. Besonders sind Frau Brigitte Müller, Frau Angelika Dorow, Frau Bettina Sarada und Frau Christel Galla hervorzuheben.

Ein liebes Dankeschön an Marianne Döhnert für das Korrekturlesen.

Der größte Dank kommt allerdings meiner Tante, Anneliese Ziebarth, Oskar und meinen Freunden, besonders Thomas Andrikowski und Michael Meyer, zu. Sie haben mir mit ihrem wohlthuenden Dasein sowie mit ihrem Zuspruch und diversen Anstößen zum Durchhalten zu jeder Zeit zur Seite gestanden und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Tausend Dank!

All denen, die nicht namentlich erwähnt wurden und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, soll an dieser Stelle ebenfalls gedankt werden.

Miriam Teschke

---

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Berlin, 01.04.2008

Miriam Teschke