

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Versuchsplanung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem qualitativen Nachweis und der quantitativen Bestimmung von *Campylobacter* spp. bei Hähnchenschenkeln aus dem Handel. Hierfür wurden verschiedene Probenahmeverfahren zur Isolierung von *Campylobacter* spp. mit zwei verschiedenen Keimzählverfahren kombiniert und die Ergebnisse verglichen. Die Untersuchungen zur Belastung von Geflügelfleisch wurden an Hähnchenschenkeln durchgeführt, da der überwiegende Teil (75%) der Hähnchen in Deutschland in zerlegter Form als Teilstücke gehandelt wird und nur 25% der Hähnchen als ganze Tierkörper angeboten werden.

Um die Verteilung der *Campylobacter*-Keimzahl auf den Hähnchenschenkeln innerhalb einer Handels-Packung zu überprüfen, wurden im Vorversuch 10 Handels-Packungen Hähnchenschenkel aus dem Berliner Einzelhandel erworben. Jede Handels-Packung enthielt 4 bis 5 Hähnchenschenkel, bei denen die Häufigkeit und Anzahl der auf der Haut lokalisierten *Campylobacter* spp. bestimmt wurden.

Für die Vergleichsuntersuchungen wurden von November 2003 bis Dezember 2004 je 10 Handels-Packungen frischer Hähnchenschenkel pro Monat, mithin 140 Handels-Packungen insgesamt, in zufällig ausgewählten Lebensmittelgeschäften des Berliner Einzelhandels aufgekauft. Jede Handels-Packung enthielt mindestens zwei Hähnchenschenkel.

Um die beiden wesentlichen Probenahmeverfahren zu vergleichen, wurde die Oberfläche des einen Schenkels in Form der abpräparierten Haut (Hautprobe), die des anderen durch Spülen der Oberfläche (Spülprobe) qualitativ und quantitativ auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht. Die Keimzahlbestimmung an diesen Haut- und Spülproben erfolgte parallel mittels Spatelverfahren und MPN-Technik.

Um festzustellen, ob die Kontamination auf die Oberfläche beschränkt ist oder auch tieferliegende Bereiche betrifft, wurden zusätzlich 115 Muskelproben qualitativ und quantitativ mittels MPN-Technik auf *Campylobacter* spp. untersucht.

Anhand der über einen Zeitraum von vierzehn Monaten ermittelten qualitativen und quantitativen Ergebnisse der Hautproben und des Muskels wurde zudem ein möglicher saisonaler Einfluss auf das Vorkommen und die Keimzahl des Erregers überprüft.

### **3.2. Material und Methoden**

#### **3.2.1. Untersuchungsmaterial**

Zur Charakterisierung der Verteilung der *Campylobacter*-Keimzahl auf Hähnchenschenkeln innerhalb einer Handels-Packung wurden 10 Handels-Packungen mit je 4-5 frischen Hähnchenschenkeln aus dem Berliner Markt erworben. Die Schenkel bestanden aus Unterschenkel, Oberschenkel und Rückenstück mit Haut.

Für den Hauptversuch kamen 140 Handels-Packungen frische Hähnchenschenkel, 10 Handels-Packungen monatlich über einen Zeitraum von vierzehn Monaten, aus zufällig ausgewählten Lebensmittelgeschäften des Berliner Einzelhandels zum Einsatz. Jede Handels-Packung enthielt mindestens zwei Schenkel, die ihrerseits aus Unterschenkel, Oberschenkel und Rückenstück mit Haut bestanden. Alle Proben stammten aus in Deutschland zugelassenen Geflügelfleischzerlegungsbetrieben. Das durchschnittliche Gewicht eines Hähnchenschenkels betrug 240 g.

Die Proben wurden in einem wärmeisolierten Behälter unter gekühlten Bedingungen transportiert und anschliessend bei 4°C im Kühlschrank in der Originalverpackung gelagert. Die bakteriologischen Untersuchungen wurden vor Ablauf der vom Hersteller angegebenen Mindesthaltbarkeitsfrist durchgeführt.

Eine Übersicht der untersuchten Probenanzahl und -arten enthält Tabelle 5.

**Tab. 5: Übersicht der untersuchten Probenanzahl und Probenart**

Probenart		Probenanzahl		
		MPN	Spatelverfahren	Tupfer
Hähnchen- schenkel	Hautprobe	40	140	–
	Spülprobe	40	90	–
	Muskel	115	–	–
	mediale Schenkel- fläche	–	–	10

### 3.2.2. Nährmedien und Reagenzien

#### 3.2.2.1. Feste Nährmedien

##### ***Campylobacter* – Selektivnährboden nach KARMALI (KARMALI et al., 1986)**

###### Basismedium (g/l Aqua bidest.)

*Campylobacter*-Agar-Basis nach Karmali, blutfrei (Oxoid, Art.-Nr. CM 935B): 43 g/l

Columbia-Agar-Basis: 39,0 g/l

Aktivkohle: 4,0 g/l

pH-Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2

Wasser: Aqua bidest.

Sterilisation: Autoclav, 100°C, 15 Minuten

###### Supplement (Hemmstoff)

*Campylobacter*-Selektiv-Supplement Karmali (Oxoid, Art.-Nr. SR 205E)

Zusammensetzung/Röhrchen (R): 2 R/l

Natriumpyruvat 50,0 mg

Cefoperazon 16,0 mg

Vancomycin 10,0 mg

Amphotericin B 5,0 mg

### **Müller-Hinton-Blutagar**

Müller-Hinton-Nährboden (Oxoid, Art.-Nr. CM 337)	38,0 g/l
Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

Zusatz: 5% steriles Schafblut 50,0 ml

pH-Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2

Wasser: Aqua bidest.

Sterilisation: Autoklav, 121°C, 15 Minuten

### **3.2.2.2. Halbfeste Nährmedien**

#### **Brucella-Bouillon**

Brucella Bouillon (Difco, Art.-Nr. 0495-17)	28,0 g/l
Pankreatisch abgebautes Casein	10,0 g/l
Peptisch abgebautes Tiergewebe	10,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
Hefeextrakt	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Natriumhydrogensulfit	0,1 g/l

pH-Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2

Wasser: Aqua bidest.

Sterilisation: Autoklav, 121°C, 15 Minuten

#### **Preston Selektiv-Anreicherungsbouillon**

##### **Basismedium, g/l**

Nährbouillon Nr. 2 (Fertigbouillon, Oxoid Art.-Nr. CM 67)	25,0 g/l
Fleischextrakt 'Lab-Lemco'	10,0 g/l
Pepton	10,0 g/l

Natriumchlorid 5,0 g/l  
 Zusatz: lysiertes Pferdeblut (Oxoid Art.-Nr. SR 48C) 50,0 ml/l  
 pH-Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2  
 Wasser: Aqua bidest.  
 Sterilisation: Autoklav, 121°C, 15 Minuten

Supplement (Anreicherung)

*Campylobacter*-Anreicherungs-Supplement (Oxoid, Art.-Nr. SR 84E)

Zusammensetzung/Röhrchen (R) 2 R/l

Natriumpyruvat 0,125 g  
 Natriumdisulfit 0,125 g  
 Eisenbisulfat 0,125 g

Supplement (Hemmstoff)

*Campylobacter*-Selektiv-Supplement (Oxoid, Art.-Nr. SR 204E)

Zusammensetzung/Röhrchen (R) 2 R/l

Polymyxin B 2500 IE  
 Rifampicin 5,0 mg  
 Trimethoprim 5,0 mg  
 Amphotericin 5,0 mg

**3.2.2.3. Kontrolle und Haltbarkeit der Nährmedien**

Nährmedium	Karmali	Müller-Hinton- Blutagar	Brucella- Bouillon
Kontrolle auf Sterilität	ja	ja	ja
physikalische Beschaffenheit	schwarz/fest	kirschrot/fest	klar-gelblich flüssig
Haltbarkeit (+2°C bis +8°C)	4 Wochen	4 Wochen	4 Wochen

### **3.2.2.4. Reagenzien für die biochemische Identifizierung und Speziesdifferenzierung von *Campylobacter* spp.**

#### **Antibiotika-Testblättchen**

Für die Bestimmung der Antibiotikaresistenz bzw. -sensibilität wurden Nalidixin- und Cephalothin-Blättchen (Oxoid, Art.-Nr. CT 0031B, Oxoid, Art.-Nr. CT 0010B) verwendet. Der Wirkstoffgehalt betrug jeweils 30 µg/Blättchen.

#### **Gramfärbung**

Zur optischen Differenzierung von *Campylobacter* spp. wurde eine Gramfärbung angefertigt. Dabei wurde die Morphologie und Färbung (Gram-negativ) des Keims beurteilt. Hierfür wurden Karbolgentiana-Violettlösung (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.09218) und Lugolsche Lösung (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.09215) verwendet.

#### **Katalase-Reagenz**

Bei einer positiven Reaktion des Katalasetests bilden *Campylobacter* spp. Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid. Hierfür wurde 35%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.08600.) mit sterilem Aqua dest. auf eine 3%ige Lösung verdünnt.

#### **Hippurathydrolyse**

Für den Hippurathydrolyse-Test wurde zunächst das Natriumsalz der Hippursäure (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.08600) mit sterilem Aqua dest. zu einer 1%igen Lösung verdünnt. Für die Herstellung des Ninhydrin-Reagenz wurde anschliessend 3,5%iges Ninhydrin (Merck, Darmstadt, Art.-Nr.6762) in einer 1:1 Mischung aus Aceton und Butanol gelöst.

#### **Indoxyl-Acetat-Hydrolyse**

Für den Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test (IAH) wurden IAH-Testblättchen hergestellt, indem 10%iges Indoxyl-Acetat (Sigma®, Art.-Nr. I-3500) in Aceton gelöst wurde. In dieser Lösung wurden anschliessend Papierblättchen (6 mm Ø, Schleicher&Schüll, Art.-Nr. 2668)

getränkt und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **3.2.2.5. Geräte**

- Sartorius Waage (Typ AC 121S)
- Stomachergerät (Lab-Blender, Modell 4000)
- Begasbarer CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Binder, CB 210) mit einer generierten Atmosphäre von 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub>
- Anaerobier-Gefässe (Becton Dickinson, BBL™, GasPak™ Anaerobier Systems) mit Gasentwicklern (Becton Dickinson, Campy Pak Plus™, Art.-Nr. 271045) in Kombination mit Kühl-Brutschränken (Heraeus, BK 6160)
- Reagenzglasmixer (neoLab®, Vortex)
- Stereomikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss, Axiostar plus)
- Temperiertes Wasserbad (GFL®)

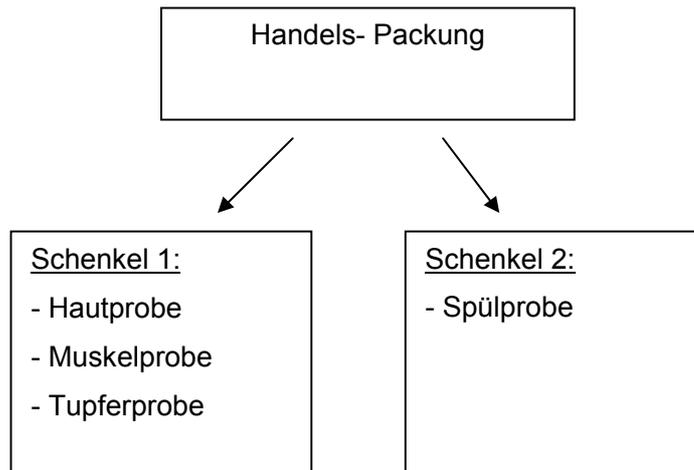
#### **3.2.2.6. Referenzstämme**

Zur Kontrolle der biochemischen Reaktionen dienen die Referenzstämme *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* DSMZ 11375 aus der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

### 3.2.3. Methoden

#### 3.2.3.1. Probenentnahme

**Abb. 2: Schematische Darstellung der Probennahme**



##### 3.2.3.1.1. Hautprobe

Von einem Hähnchenschenkel aus der jeweils untersuchten Handels-Packung wurden 25 g Haut, dies entspricht annähernd der ganzen Haut eines Schenkels, mit einem sterilen Skalpell und einer sterilen Pinzette entfernt und anschliessend in einem Stomacherbeutel mit 225 ml Preston-Bouillon eingewogen und für 120 s mit einem Stomacher-Blender homogenisiert. Die Preston-Bouillon und die darin enthaltene Haut wurden in einen mit Aluminiumfolie verschlossenen Erlenmayer-Kolben überführt. Die Hautprobenentnahme ist in Abbildung 3 dargestellt.

**Abb. 3: Sterile Präparation der Haut**



#### **3.2.3.1.2. Muskelprobe**

Nach dem Entfernen der Haut wurde die subkutane Fläche des Schenkels zur Sterilisation kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen, damit eine sterile Präparation des inneren Muskelbereiches erfolgen konnte. Anschliessend wurden die oberen Muskelschichten unter keimfreien Bedingungen mittels Skalpell und Pinzette entfernt und eine Muskelprobe von 10 g aus der Tiefe entnommen. Diese wurde mit 90 ml Preston-Bouillon für 120 s mittels Stomacher-Blender homogenisiert und in einen mit Aluminiumfolie verschlossenen Erlenmeyer-Kolben überführt. Auch dieser Vorgang ist fotografisch wiedergegeben (Abb. 4).

**Abb. 4: Sterile Entnahme der Muskelprobe**



#### **3.2.3.1.3. Beprobung der medialen Schenkelfläche (Tupferprobe)**

Nach dem Entfernen der Haut und der Entnahme der Muskelprobe wurde die hautfreie mediale Schenkelfläche, wie sie Abb. 5 zeigt, mit einem in 0,1%igem Peptonwasser angefeuchteten, sterilen Tupfer beprobt, indem das gesamte Areal vertikal, horizontal und diagonal unter gleichmässigem Druck überstrichen wurde. Der Tupfer wurde anschliessend auf Karmali Agar ausgestrichen und dieser für 48 h bei 42°C unter mikraeroben Bedingungen inkubiert. Diese Untersuchung wurde an 10 Proben durchgeführt (vgl. Tab. 5).

**Abb. 5: Hautfreie mediale Schenkelfläche (ovale Fläche)**



#### **3.2.3.1.4. Spülprobe**

Der zweite Hähnchenschenkel einer Handels-Packung wurde in einem Stomacherbeutel mit 225 ml Preston-Bouillon für 30 s gespült und abmassiert, was Abb. 6 zeigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gesamte Schenkeloberfläche, d.h. die hautfreien und die mit Haut bedeckten Partien, mit der Spülflüssigkeit in Berührung kam. Anschliessend wurde die Spüllösung in einen mit Aluminiumfolie verschlossenen Erlenmayer-Kolben überführt.

**Abb. 6: Spülen des Schenkels in Preston-Bouillon (Spülprobe)**



### **3.2.3.2. Anfertigen der Verdünnungsstufen**

Aus den Haut- und Spülproben wurden Dezimalverdünnungen bis zur Stufe  $10^{-4}$  für den MPN Ansatz und bis zu Stufe  $10^{-2}$  für das Spatelverfahren angelegt; die Muskelproben wurden bis zur Stufe  $10^{-2}$  verdünnt.

### **3.2.3.3. Qualitativer Nachweis von *Campylobacter* spp.**

Nach Anfertigen der Dezimalverdünnungen wurden die in der Preston Bouillon verbliebenen Proben zur Anreicherung für den qualitativen Nachweis bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 24 h in einem  $\text{CO}_2$ -Brutschrank unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert und anschliessend auf Karmali Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  unter wiederum mikroaeroben Bedingungen wurden verdächtige Kolonien mittels Phasenkontrast-Mikroskop auf *Campylobacter*-typische Morphologie und Beweglichkeit überprüft.

### 3.2.3.4. Quantitative Bestimmung von *Campylobacter* spp.

#### 3.2.3.4.1. Keimzahlbestimmung mittels MPN–Technik

##### Hautprobe

Für den MPN-Ansatz der Hautprobe wurden 10 ml der ersten Verdünnungsstufe in jeweils 3 leere Reagenzgläser überführt, so dass sich ein Inokulum von 1 g pro Röhrchen ergab. Zudem wurden jeweils 1 ml aus jeder weiteren Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ) in je 3 Reagenzgläser mit 9 ml Preston-Bouillon überführt. Somit ergab sich ein MPN-Design von 3 x 1 g, 3 x 0,1 g, 3 x 0,01 g, 3 x 0,001 g und 3 x 0,0001 g (Tabelle 6).

**Tab. 6: MPN Ansatz für die Hautprobe**

Verdünnungsstufe	Probenmenge (ml) pro Röhrchen	Inokulum
$10^0$	10 ml in 3 leere Röhrchen	1 g
$10^{-1}$	jeweils 1 ml in 3 Röhrchen á 9 ml PB	0,1 g
$10^{-2}$		0,01 g
$10^{-3}$		0,001 g
$10^{-4}$		0,0001 g

##### Muskelprobe

Der MPN-Ansatz der Muskelprobe entsprach dem der Hautprobe, die Dezimalverdünnung erfolgte jedoch nur bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ , da im Fleisch von einer geringeren Keimzahl als auf der Haut ausgegangen wurde. Somit ergab sich ein MPN-Design von 3 x 1 g, 3 x 0,1 g, 3 x 0,01 g (Tabelle 7).

**Tab. 7: MPN Ansatz für die Muskelprobe**

Verdünnungsstufe	Probenmenge (ml) pro Röhrchen	Inokulum
$10^0$	10 ml in 3 leere Röhrchen	1 g
$10^{-1}$	jeweils 1 ml in 3 Röhrchen á 9 ml PB	0,1 g
$10^{-2}$		0,01 g

**Spülprobe**

Für den MPN-Ansatz der Spülprobe wurden 10 ml der unverdünnten Spüllösung in jeweils 3 leere Reagenzgläser überführt. Zudem wurden 1 ml der unverdünnten Spülprobe und jeweils 1 ml aus jeder weiteren Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ) in je 3 Reagenzgläser mit 9 ml Preston-Bouillon überführt. Somit ergab sich ein MPN-Design von 3 x 10 ml, 3 x 1 ml, 3 x 0,1 ml, 3 x 0,01 ml, 3 x 0,001 ml und 3 x 0,0001 ml (Tabelle 8).

**Tab. 8: MPN Ansatz für die Spülprobe**

Verdünnungsstufe	Probenmenge (ml) pro Röhrchen	Inokulum
$10^0$	10 ml in 3 leere Röhrchen	10 ml
$10^0$	jeweils 1 ml in 3 Röhrchen á 9 ml PB	1 ml
$10^{-1}$		0,1 ml
$10^{-2}$		0,01 ml
$10^{-3}$		0,001 ml
$10^{-4}$		0,0001 ml

Die inokulierten MPN-Röhrchen der Haut-, Muskel- und Spülprobe wurden bei 42°C für 24 h microaerob in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Anschliessend wurden aus jedem bebrüteten Röhrchen 10 µl Material auf einem Karmali Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 42°C unter microaeroben Bedingungen konnten *Campylobacter*-verdächtige Kolonien mittels Phasen-Kontrast-Mikroskop auf typische Morphologie und Beweglichkeit untersucht und die Anzahl positiver Röhrchen jeder Verdünnungsstufe anhand der *Campylobacter*-positiven Platten ermittelt werden. Aus der Kombination positiver Ergebnisse ließ sich die *Campylobacter*-Anzahl der Haut -, Spül -

und Muskelproben mit Hilfe einer statistischen MPN-Tabelle abschätzen.

#### **3.2.3.4.2. Keimzahlbestimmung mittels Spatelverfahren**

Für das Spatelverfahren wurden 1 ml der ersten Verdünnungsstufe der Hautprobe bzw. 1 ml der unverdünnten Spülprobe auf jeweils drei Karmali-Agar-Platten und zusätzlich 0,1 ml der ersten und zweiten Verdünnungsstufe auf jeweils eine Karmali-Agar-Platte im Doppelansatz ausgespatelt.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 42°C unter microaeroben Bedingungen wurden *Campylobacter*-verdächtige Kolonien mittels Phasenkontrast-Mikroskop anhand der typischen Morphologie und Beweglichkeit identifiziert und ausgezählt. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten je g bzw. ml wurde über das gewogene arithmetische Mittel berechnet.

#### **3.2.3.5. Biochemische Identifizierung und Speziesdifferenzierung**

Für die weitere Identifizierung der thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* erfolgte eine Subkultivierung verdächtiger Einzelkolonien auf Müller-Hinton-Blutagar (MHB-Agar). Hierfür wurde eine *Campylobacter*-verdächtige Einzelkolonie von Karmali-Agar auf MHB-Agar mittels Platinöse überimpft und weitere 24 Stunden bei 42°C unter microaeroben Bedingungen inkubiert. *Campylobacter*-verdächtige Kolonien stellen sich als flache bis konvexe, graue, z.T. metallisch glänzende Kolonien mit glatter Oberfläche dar.

Mit den Reinkulturen der 24 h lang inkubierten MHB-Agar-Platten wurde ein Katalase-Test, eine Gram-Färbung und eine Überimpfung in 5 ml Brucella-Bouillon durchgeführt. Der MHB-Agar und die Brucella-Bouillon wurden anschliessend für weitere 24 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Mit den stärker gewachsenen Reinkulturen der 48 h inkubierten MHB-Agar-Platten wurde der Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test und der Hippurathydrolyse-Test durchgeführt. Die Brucella-Bouillon diente als Ausgangsmedium für die Untersuchung auf Beweglichkeit, für die Wachstumsüberprüfung bei 25°C und 43°C und für den Test auf Nalidixinsäure- und Cephalothin-Empfindlichkeit.

Der Untersuchungsgang der Probenaufbereitung, Isolierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp. ist in Abbildung 7 zusammengestellt. Tabelle 9 zeigt die wichtigsten Differenzierungsmerkmale thermophiler *Campylobacter* spp. in der Übersicht.

Für die Identifizierung und Differenzierung der thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* wurden folgende biochemische Verfahren angewandt:

### **Gram-Färbung**

Mit einer Platinöse wurden Kolonien der Reinkulturen vom MHB-Agar auf einen Objektträger aufgebracht, nach Gram gefärbt und anschliessend unter dem Lichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) betrachtet. *Campylobacter* spp. zeigen sich als Gram-negative, gebogene bis korkenzieherartige Stäbchen mit einer Länge von 0,5 bis 0,8 µm und einer Breite von 0,3 bis 0,4 µm.

### **Test auf Beweglichkeit und Morphologie**

Mit einer einmal verwendbaren Impfpöse wurden 10 µl aus der beimpften Brucella-Bouillon auf einen Objektträger aufgebracht und über den hängenden Tropfen im Phasenkontrast-Mikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung auf Beweglichkeit überprüft. Anstelle der Brucella-Bouillon kann auch Koloniematerial vom bebrüteten MHB-Agar verwendet werden, das in isotonischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger suspendiert wird. *Campylobacter* spp. haben eine gebogene bis spiralig gewundene, gelegentlich auch gerade Form und zeigen eine schnelle, korkenzieherartige Bewegung.

### **Katalase-Aktivität**

Kolonien der Reinkultur vom MHB-Agar wurden mit einer Platinöse auf einen Objektträger übertragen und mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung betropft. Bei Vorhandensein des Enzyms Katalase kommt es unter Bläschenbildung zur Bildung von Sauerstoff und Wasser aus Wasserstoffperoxid. Als Positivkontrolle diente der Referenzstamm *C. jejuni* (DSMZ 4688).

### **Nalidixinsäure- und Cephalothin-Empfindlichkeit**

Auf einem MHB-Agar wurden zunächst 0,1 ml von der 24h inkubierten Brucella-Bouillon ausgespatelt und anschliessend jeweils ein Nalidixin- und Cephalothinblättchen aufgebracht. Nach einer Inkubation von 48 h bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen wurden *Campylobacter* spp. dann als sensibel beurteilt, wenn sich sichtbare Hemmhöfe um die Antibiotika-Testblättchen gebildet hatten. Entstanden keine Hemmhöfe, wurden die Keime als resistent bewertet.

### **Wachstum bei 25°C und 43°C**

Von der 24 h inkubierten Brucella-Bouillon wurde jeweils eine Öse Koloniematerial auf MHB-Agar ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 48 h bei 25°C und 43°C unter mikroaeroben Bedingungen wurde das Wachstum beurteilt. Als Negativkontrolle wurde der Referenzstamm *C. jejuni* (CSM 4688) bei 25°C mit inkubiert.

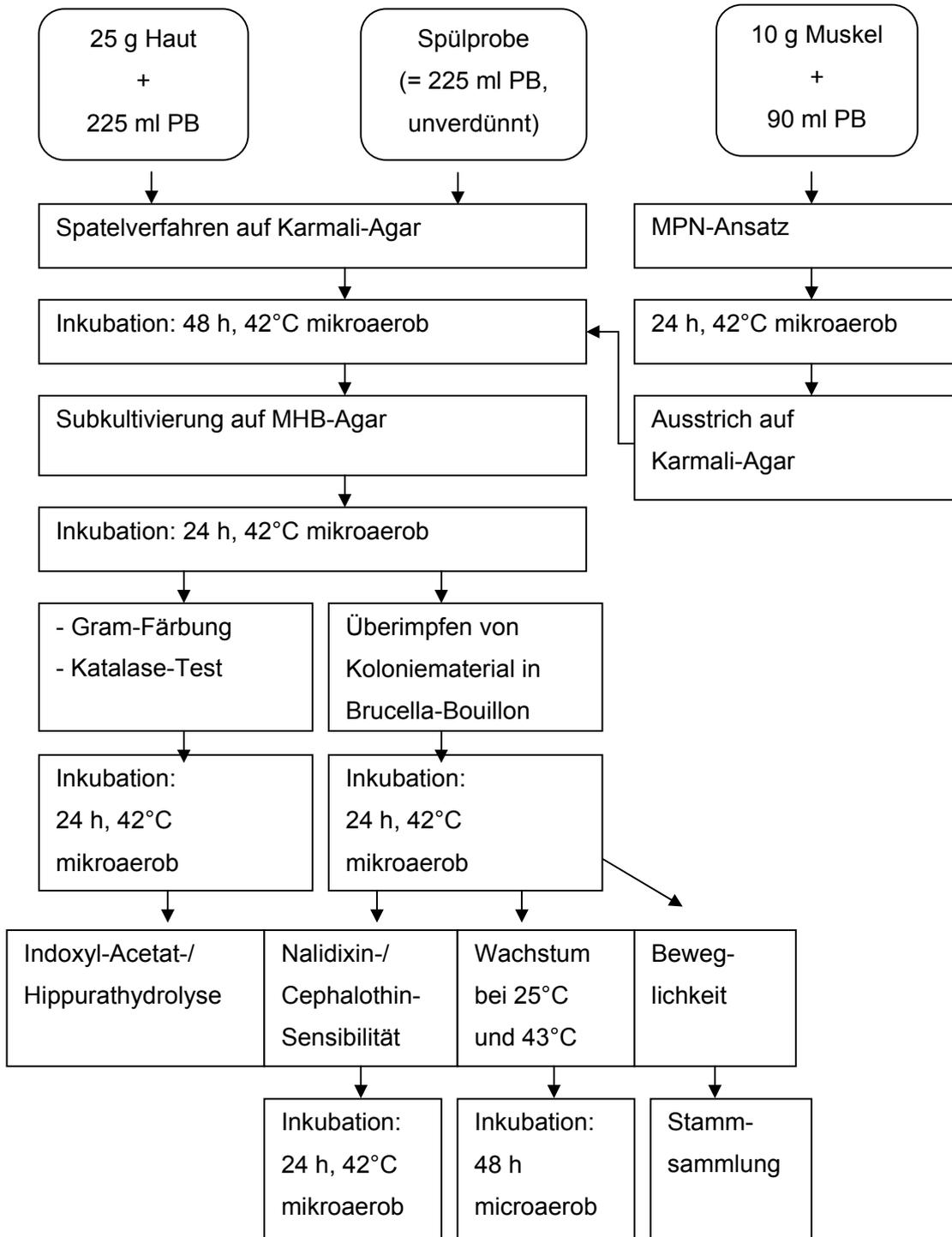
### **Indoxy-Acetat-Hydrolyse-Test**

Auf den Testblättchen wurde mit einer Platinöse Koloniematerial vom MHB-Agar verrieben und ein Tropfen Aqua dest. aufgebracht. Färbte sich das Blättchen nach 30 Minuten dunkelblau, war der Test positiv, ein Ausbleiben der Farbreaktion hingegen galt als negativ. Als Positivkontrolle kamen die Referenzstämme *C. jejuni* (DSMZ 4688) und *C. coli* (DSMZ 4689), als Negativkontrolle der Referenzstamm *C. lari* (DSMZ 11375) zum Einsatz.

### **Hippurathydrolyse Test**

Eine Öse Koloniematerial der Reinkultur wurde in 0,4 ml 1%ige Na-Hippuratlösung überimpft und in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach Ablauf von 2 Stunden wurde 0,2 ml Ninhydrin-Reagenz hinzugefügt und weitere 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Bei einem Farbumschlag nach dunkelviolet wurde der Test als positiv gewertet, blieb die Lösung klar, galt die Reaktion als negativ. Zur Positivkontrolle wurden der Referenzstamm *C. jejuni* (DSMZ 4688) und als Negativkontrolle *C. coli* (DSMZ 4689) mit angesetzt.

**Abb. 7: Untersuchungsgang der Probenaufbereitung, Isolierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.**



PB = Preston-Bouillon

**Tab. 9: Kulturelle und biochemische Differenzierung thermophiler *Campylobacter* (modifiziert nach VANDAMME und GOOSSENS, 1992)**

Spezies	Biochemische Reaktion			Wachstum		Antibiotika-sensibilität	
	Katalase	Hippurathydrolyse	Indoxylacetat	25°C	43°C	Nalidixinsäure	Cephalothin
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	+	-	+	s	r
<i>C. coli</i>	+	-	+	-	+	s	r
<i>C. lari</i>	+	-	-	-	+	v	r

+ = positive Reaktion; - = negative Reaktion; s = sensibel; r = resistent; v = variabel

### 3.2.3.6. Stammsammlung der *Campylobacter*-Isolate

#### Stammhaltung auf Bouillon

Die *Campylobacter*-Isolate wurden einer Stammsammlung zugeführt und bei -80°C gelagert. Als Ausgangsmedium dienten 10 ml beimpfte Brucella-Bouillon, der 0,4 ml steriles Glycerin als Kryoprotektivum hinzugefügt wurde. Jeweils 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde in ein steriles, zu drei Viertel mit Glasperlen befülltes Glasröhrchen pipettiert, bis die obersten Perlen benetzt waren. Anschliessend wurde das Röhrchen mit einem Schraubverschluss abgedichtet.

## Stammhaltung auf Mikrobank

Die *Campylobacter*-Isolate wurden zusätzlich in Mikrobank-Röhrchen, in denen Kügelchen in einem hypertonischen Medium enthalten sind, an die sich die Bakterien binden, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Beimpft werden die Röhrchen entweder mittels Ösenabstrich von bebrütetem MHB-Agar oder mit einer Öse Bakteriensuspension der beimpften Brucella-Bouillon. Nach vorsichtigem Schütteln wurde das Medium abgesaugt und die Röhrchen verschlossen.

### 3.2.3.7. Berechnung der Keimzahl und statistische Methoden

Aufgrund der unterschiedlichen Bezugseinheit von Hautprobe (KbE/g) und Spülprobe (KbE/ml) gestaltete sich ein Keimzahlvergleich mit gewichtsbezogenen Daten schwierig. Aus diesem Grund war es erforderlich, die jeweiligen Keimzahlergebnisse pro Gewichtseinheit auf den entsprechenden Schenkel hochzurechnen. Um den Vergleich der Probenahmetechniken Haut- und Spülprobe und der Zählverfahren MPN-Technik und Spatelverfahren anhand der ermittelten *Campylobacter*-Keimzahlen pro Schenkel zu ermöglichen, wurden die *Campylobacter*-Keimzahlen der Hautprobe (KbE/g Haut) mit dem Faktor 25 multipliziert, da 25 g Haut eingewogen wurde und die der Spülprobe (KbE/ml) mit dem Faktor 225 multipliziert, da der Schenkel mit 225 ml gespült wurde. Die Keimzahlergebnisse wurden anschliessend in log KbE/ Schenkel umgerechnet.

Für die Untersuchungen der quantitativen Belastung von *Campylobacter* auf der Haut von Hähnchenschenkeln während der Beprobungsmonate November 2003 bis Dezember 2004 sind die Keimzahlen in log KbE/g angegeben. Die Keimzahlergebnisse der Muskelproben sind in MPN *Campylobacter*/g angegeben, da aufgrund der geringen Keimzahl auf eine Umrechnung in log KbE/g verzichtet werden konnte.

Die untere Nachweisgrenze des Spatelverfahrens liegt bei 1 KbE/ml Spülflüssigkeit (225 KbE/Schenkel) bzw. 10 KbE/g Haut (250 KbE/Schenkel), während die Nachweisgrenze der MPN-Technik 0,03 MPN *Campylobacter*/ml Spülflüssigkeit bzw. 0,3 MPN *Campylobacter*/g Haut beträgt.

Für den Vergleich der Probenahmeverfahren Haut- und Spülprobe wurde der Student's t-Test für unabhängige Beobachtungen, für die Bewertung der Keimzählverfahren MPN-Technik und Spatelverfahren für abhängige Beobachtungen verwendet.

Die Prävalenz von *Campylobacter* in Haut und Muskelproben wurde mit Hilfe des Chiquadrat-Tests, die *Campylobacter*-Keimzahl mittels Wilcoxon-Test ausgewertet. Die Verteilung der Anzahl von *C. jejuni* und *C. coli* in Hautproben wurde mittels Mann-Whitney-U-Test beurteilt.

Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software SPSS 12.0 durchgeführt.