

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie

Der Gattungsname „*Campylobacter*“ (griechisch: κάμπύλος gekrümmt) wurde zum ersten Mal 1963 von Sebald und Veron vorgeschlagen (Sebald and Veron, 1963) und umfasste lediglich die beiden Spezies *C. fetus* und *C. bubulus* (heute als *C. sputorum* biovar *sputorum* benannt), die zuvor als *Vibrio*- Spezies bezeichnet wurden. Aufgrund der sich immer weiterentwickelnden Methoden zur Erforschung taxonomischer Beziehungen fanden auch andere Spezies ihren Platz in der Gattung *Campylobacter*. Heute gehören 16 Spezies und sechs Subspezies zur Gattung. Andere früher so genannte *Campylobacter*- ähnliche Organismen wurden in die phylogenetisch eng verwandten Gattungen *Arcobacter*, *Helicobacter* und *Sulfurospirillum* eingruppiert (Anonymus, 2002). Die Abb. 1 zeigt eine Übersicht zu den Spezies und Subspezies bzw. Biovaren der Gattung *Campylobacter*.

Ordo: <i>Campylobacterales</i>		
Familia: <i>Campylobacteraceae</i>		
Genus	Spezies	Subspezies/Biovar
<i>Campylobacter</i>		
	<i>C. coli</i>	
	<i>C. concisus</i>	
	<i>C. curvus</i>	
	<i>C. fetus</i>	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
	<i>C. gracilis</i>	
	<i>C. helviticus</i>	
	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i> <i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> <i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>
	<i>C. lari</i>	
	<i>C. lanienae</i>	
	<i>C. mucosalis</i>	
	<i>C. rectus</i>	
	<i>C. showae</i>	
	<i>C. sputorum</i>	Biovare: <i>sputorum</i> , <i>faecalis</i> , <i>paraureolyticus</i>
	<i>C. upsaliensis</i>	

Abb. 1: Taxonomie von *Campylobacter* spp. (nach Anonymus, 2002)

2.2 Eigenschaften

2.2.1 Bakterienmorphologie

Campylobacter spp. sind gram- negative, nicht sporenbildende Bakterien in Form von schlanken leicht gebogenen oder spiralig gedrehten Stäbchen (Abb. 2). Alte oder geschädigte Zellen können auch kokkoide Formen annehmen (Hudock et al., 2005; Boucher et al., 1994; Griffiths, 1993; Buck et al., 1983). Sie sind 0,2-0,8 μm breit und 0,5-5 μm lang. Die meisten Spezies sind durch Vorhandensein einer unbescheideten Flagelle an einem oder beiden Zellenden beweglich und zeigen eine typische korkenzieherartige Fortbewegung. Ausnahmen bilden die unbewegliche Spezies *C. gracilis* und *C. showae* mit multiplen Flagellen.

Als Besonderheit sind die lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Formen (VBNC, viable- but- nonculturable cells) zu nennen, die eine Isolierung erschweren (Tholozan et al., 1999; Beumer et al., 1992). Während bei Cappelier et al. (1999) *C. jejuni*- Isolate in der VBNC- Phase ihre Kultivierbarkeit und Enteropathogenität nach intestinaler Passage wiedererlangten, waren bei anderen Studien VBNC von *C. jejuni* nicht in der Lage, nach Darmassage in einen kultivierbaren Zustand zurückzukehren und Symptome auszulösen (Ziprin and Harvey, 2004; Beumer et al., 1992; Medema et al., 1992).

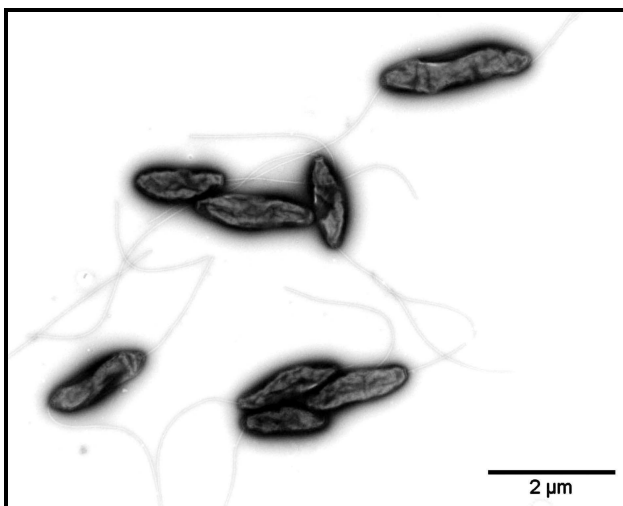


Abb. 2: Morphologie von *C. jejuni* mit bipolarer Begeißelung (Aufnahme im Transmissionselektronenmikroskop; Quelle: Dr. Reetz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin)

2.2.2 Koloniemorphologie

Nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden wachsen *Campylobacter* spp. als ca. 2 mm große, runde, glattglänzende, graue, manchmal auch gelblich oder bräunlich erscheinende Kolonien (Abb. 3). Auf frischem Agar kommen auch zerfließende Formen vor. Nach Aufnahme mit einer Öse zeigt das Koloniematerial eine gelb- bis rotbräunliche Färbung.

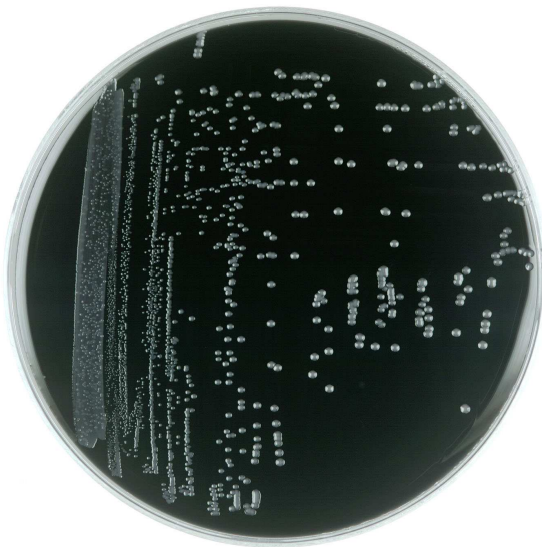


Abb. 3: Koloniemorphologie von *C. jejuni* auf Karmali- Agar nach 48h Bebrütung in mikroaerober Atmosphäre bei 42°C

2.2.3 Biochemische Eigenschaften

Typische biochemische Eigenschaften sind das Vorhandensein der Oxidase- Aktivität und bei den meisten Spezies die Nitrat- Reduktion sowie das Fehlen der Hippurat- Hydrolyse, lediglich *C. jejuni* zeigt eine positive Reaktion. Die Katalase- Reaktion ist bei einigen Spezies vorhanden, bei anderen fehlt sie oder ist variabel.

Campylobacter spp. verstoffwechseln Kohlenhydrate weder fermentativ noch oxidativ sondern beziehen ihre Energie aus der Verwertung von Aminosäuren oder Zwischenprodukten aus dem Fettsäurezyklus.

Campylobacter spp. sind unterschiedlich in der Lage, α - Ketoglutarat, Fumarat, Succinat und Asparginsäure zu metabolisieren (Mohammed et al., 2004).

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten biochemischen Eigenschaften der *Campylobacter*- Spezies.

	Kat	αHäm	Hipp	IAH	Ure	NR	Wachstum			
							25°C	42°C	NaCl (4%)	Gly (1%)
<i>C. coli</i>	+	v	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>C. concisus</i>	-	v	-	-	-	v	-	v	-	v
<i>C. curvus</i>	-	v	v	v	-	+	-	v	-	+
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	-	-	-	-	+	+	v ^a	-	+
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	v ^a	v	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>C. gracilis</i>	v	-	-	v	-	v ^a	-	v	-	+
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	+	-	+	-	+	-	v
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	+	v	-	-	-	+	v	+	-	+
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	+	v	-	-	+	+	-	+	-	v
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	v	+	+	+	-	-	-	-	-	v
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>C. lari</i>	+	v	-	-	v	+	-	+	-	+
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	v
<i>C. rectus</i>	v	+	-	+	-	+	-	v	-	+
<i>C. showae</i>	+	+	-	v	-	+	-	v	-	v
<i>C. sputorum</i>	v	+	-	-	v	+	-	+	v	+
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	-	+	-	+	-	v ^a	-	+

+, über 90% der Stämme zeigen diese Eigenschaft; -, weniger als 11% der Stämme zeigen diese Eigenschaft; v, Stammabhängige Reaktion; ^a wenigsten 80% der Stämme beinhalten diese Charakteristik; Kat, Katalase; αHäm, alpha- Hämolyse; Hipp, Hippurat- Hydrolyse, IAH, Indoxyl- Acetat- Hydrolyse; Ure, Urease; NR, Nitratreduktion; NaCl, Natriumchlorid; Gly, Glyzin

Tab. 1: Biochemische Eigenschaften von *Campylobacter* spp. (nach On and Holmes, 1995)

2.2.4 Pathogenitätsfaktoren

Um seine krankmachende Wirkung im Wirtsorganismus zu entfalten, nutzen *Campylobacter* spp. verschiedene Mechanismen. Hierzu zählen Motilität, Chemotaxis, Adhäsion, Invasion und die Bildung von Toxinen.

C. jejuni bedient sich folgender Diarrhoe- Mechanismen: Hemmung der Absorptionsfunktion der Zellen, Änderung der epithelialen Resistenz und Rearrangement der tight- junction- Proteine (Mac Callum et al., 2005).

Viele Gene, die in die Kolonisation involviert sind, wie *racR/S*, *cadF*, *cdt*, *ciaB* und die Flagellin- Gene sind bei verschiedenen *Campylobacter*- Spezies konserviert, im Gegensatz zu den Variationen im Lipooligosaccharid-, Kapsel- Polysaccharid- und im mutmaßlichen *licABCD*- Virulenz- Locus (Fouts et al., 2005).

2.2.4.1 Motilität und Chemotaxis

Durch das Vorhandensein von Flagellen und der daraus resultierenden korkenzieherartigen Bewegung sind *Campylobacter* spp. in der Lage, sich in viskösen Medien fortzubewegen. So sind intakte und motile Flagellen wichtig für die Kolonisation in Masthähnchen (Ziprin et al., 2005; Nachamkin et al., 1993). Dabei wirken L- Fruktose, L- Serin und Mucin als Bestandteile von Mucinschicht und Gallensaft chemotaktisch positiv, wohingegen Gallensäuren chemotaktisch negativ wirken

(Hugdahl et al., 1988). Die chemotaktische Wirkung von Mucin zeigt sich in der Ansiedlung von *Campylobacter* spp. in den Mukus- gefüllten Darmkrypten (Berry et al., 1988). Die vorhandene Resistenz gegenüber Gallensalzen, hervorgerufen durch Aktivierung der CmeABC- Efflux- Pumpe (Lin et al., 2005) und moduliert vom *Campylobacter*- bile- resistance- regulator (CbrR), unterstützt die Kolonisation (Raphael et al., 2005; Lin et al., 2003).

2.2.4.2 Adhäsion

Die Adhäsion an Darmzellen verlangt nach dem Vorhandensein von Zellrezeptoren und entsprechenden Adhäsinen. Die am besten charakterisierten Adhäsine sind CadF (*Campylobacter* adhesin to fibronectin), JlpA (*jejuni* lipoprotein A) und PEB1. Andere Moleküle, die als Zelloberflächenantigene fungieren, sind das Flagellum, Lipooligo- und Lipopolysaccharide (LOS, LPS), das Major Outer- Membrane- Protein (MOMP) und P95 (Fouts et al., 2005; Konkel et al., 2005; Papp- Szabo et al., 2005; McSweegan and Walker, 1986).

Nach Interaktion mit Wirtszellmembranrezeptoren leitet *C. jejuni* die Signaltransduktion zur bakteriellen Internalisation ein. Dabei initialisiert *C. jejuni* die Kalzium- Freigabe aus intrazellulären Lagern und induziert sowohl die Produktion von Zytokinen in Darmepithelzellen als auch die Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen (Hu et al., 2005; Hu and Hickey, 2005; Watson and Galan, 2005).

Lipooligosaccharide sind zur molekularen Mimikry in der Lage und nehmen damit eine wichtige Rolle in der Umgehung der Wirtsimmunantwort und dem Hervorrufen einer Autoimmunreaktion neben der Wichtigkeit für die Anhaftung und Invasion ein (Fouts et al., 2005; Karlyshev et al., 2005). Bei einigen *Campylobacter*- Stämmen ähneln die Lipooligosaccharide menschlichen Gangliosiden. Antikörper gegen diese Strukturen werden verdächtigt, eine Rolle in der Entstehung des Guillain- Barré- Syndroms zu spielen (Hughes and Cornblath, 2005).

2.2.4.3 Invasion

Hänel et al. (2004) zeigten, dass eine positive Korrelation zwischen dem Kolonisationsvermögen von *Campylobacter* spp. im Hühnerdarm und der Invasion in einem *in vitro* Modell mit Caco- 2- Zellen besteht. Für die Invasion sezerniert *C. jejuni* eine Reihe von „*Campylobacter* invasive antigen proteins“ (Cia proteins). Die Cia- Proteine werden vom Flagellen- Export- Apparat abgesondert. Dabei erfordert der Cia- Export wenigstens eines der beiden Filament- Proteine FlaA oder FlaB. Die maximale Invasion benötigt die Sekretion von Cia- Proteinen und motile Bakterien (Konkel et al., 2004).

Fouts et al. (2005) beschrieben für einen *C. lari*- Stamm ein Peptid, das dem *Yersinia*- Invasions- Protein ähnelt und vermuteten, dass dieser Stamm auch in der Lage ist, Wirtszellen zu penetrieren.

2.2.4.4 Toxine

Bei *Campylobacter* spp. wurde die Produktion von Entero- und Zytotoxinen (CDT, 70 kDa cytotoxin, Vero/HeLa cell cytotoxin, Shiga- like toxin, Hemolytic cytotoxin, Hepatotoxin) beschrieben (Wassenaar, 1997).

Das am besten charakterisierte Toxin ist das Cytolethal distending toxin (CDT), welches die DNA direkt schädigt (Abuoun et al., 2005). Es besteht aus drei Proteineinheiten (CdtA, CdtB, CdtC), die im Verhältnis 1:1:1 im CDT- Holotoxin vorkommen. CdtB ist eine Nuklease, die doppelsträngige Schnitte in der Wirtszell- DNA verursacht. CdtA und CdtC zeigen eine 40%ige Sequenzübereinstimmung und können beide an der Oberfläche von HeLa- Zellen mit Spezifität binden. CdtB kann dies nicht. CDT verursacht einen Stillstand des Zellzykluses und in empfindlichen eukaryotischen Zellen den Tod. Während eine einzelne Protein- Untereinheit keinen G2- Stillstand zeigt, verursachen 2 µg von CdtBC bei 80% und 0,5 µg von CdtABC bei 95% der HeLa- Zellen einen G2- Stillstand. Alle drei Cdt- Proteine sind demnach für eine maximale Wirkung nötig (Lee et al., 2003). CDT- neutralisierende Antikörper wurden in infizierten Menschen aber nicht in infizierten Hühnern gebildet (Abuoun et al., 2005). Ismaeel et al. (2005) zeigten, dass subtherapeutische Antibiotika- Konzentrationen von Ciprofloxacin und Erythromycin eine ansteigende toxische Wirkung von CDT- positiven *C. jejuni*- Isolaten auf INT 407- und HeLa- Zellen hatte.

Verschiedene Autoren beschrieben die Enterotoxinbildung bei einigen *Campylobacter*- Stämmen von an Durchfall erkrankten Patienten und sprechen ihnen eine Rolle in der Pathogenität zu (Lindblom et al., 1989; Ruiz- Palacios et al., 1983).

Die Toxizität von *C. jejuni*- Hühner- Isolaten war niedriger als von Human- Isolaten, was darauf deutet, dass nicht alle Wildtypen vom Geflügel gleich wichtig als humanes lebensmittelassoziertes Pathogen agieren (Gilbert and Slavik, 2004).

2.2.4.5 Andere Faktoren

Die Fähigkeit der Eisenaufnahme ist wichtig zum Überleben in der Umwelt und während der Infektion in einem Wirt. Eisen dient auch bei *Campylobacter* spp., wie bei vielen anderen Bakterien, zum Elektronentransport und als Cofaktor für Enzyme. Zur Eisenaufnahme bedient sich *C. jejuni* eines Hämin-/Hämoglobin- Aufnahme- Systems, eines möglichen Außenmembran- Siderophor- Rezeptors, Komponenten eines

mutmaßlichen Eisen- Aufnahme- ABC- Transport- Systems, eines putativen Eisen- Aufnahme- Proteins und dem periplasmatischen Protein p19. Außerdem verfügt *C. jejuni* über ein Schutzsystem gegenüber Superoxide und Peroxide. Dieses beinhaltet die Superoxid- Dismutase, die Endonuklease IV, die Katalase, die Alkyl- Hydroperoxid- Reduktase und verschiedene Oxidoreduktasen (Sampathkumar et al., 2006). Die HtrA- Protease von *C. jejuni* ist für die Hitze- und Sauerstofftoleranz und für eine optimale Interaktion mit humanen Epithelzellen erforderlich (Brondsted et al. 2005).

Verschiedene Virulenz- Gene (*racR*, *virB11*, *wlaN*, *cgtB*) wurden mit unterschiedlichen Prävalenzen in *C. jejuni*- Stämmen detektiert (Kordinas et al., 2005). Das pVir- Plasmid wurde in einigen *C. jejuni*- Stämmen identifiziert und war signifikant mit blutigem Stuhl assoziiert (Schmidt- Ott et al., 2005; Tracz et al., 2005).

2.2.5 Tenazität

Das Überleben von *Campylobacter* spp. ist sowohl von den Stammeigenschaften als auch von den Umweltbedingungen abhängig. Die Erreger können in der Umwelt einige Zeit überleben, können sich aber nicht wie andere Pathogene (*Salmonellen*, *E. coli*) außerhalb des Wirtsorganismus vermehren. Die optimalen Wachstumsbedingungen für thermophile *Campylobacter* spp. sind in der Tabelle 2 dargestellt.

Parameter	Minimum	Optimum	Maximum
Temperatur	32°C	42°C - 43°C	45°C
a _w - Wert	> 0,987	0,997	-
NaCl- Konzentration	-	0,5	1,5
pH- Wert	4,9	6,5 - 7,5	ca. 9,0
Atmosphäre	-	5% O ₂ + 10% CO ₂	-

Tab. 2: Anforderungen an die Vermehrung von thermophilen *Campylobacter* spp. (Anonymus, 1998)

2.2.5.1 Temperatur

Die optimalen Temperaturen für thermophile *Campylobacter* spp. liegen bei 42°C, und auch bei Temperaturen zwischen 32°C und 45°C ist ein Wachstum noch möglich (Anonymus, 1998). Sie sind nicht in der Lage, sich bei Temperaturen unter 30°C zu vermehren (Glünder, 1993). Ein Überleben bei Raumtemperatur ist jedoch möglich, aber vor allem auf trockenen Oberflächen nicht von langer Dauer (Blankenship and Craven, 1982). Je mehr sich die Temperaturen dem Gefrierpunkt nähern, desto länger können sie überleben (Buswell et al., 1998; Blaser et al., 1980). Dabei unterstützt Feuchtigkeit und eine sauerstoffarme Atmosphäre die Überlebensdauer. Tabelle 3

zeigt die Überlebensfähigkeit von *C. jejuni* in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Temperaturen.

Matrix	Temperatur	Überlebenszeit
Faezes (human)	4°C	drei Wochen
	25°C	eine Woche
Galle (human)	4°C	zwei Monate
	25°C	drei Wochen
	37°C	drei Monate
Urin (human)	4°C	fünf Wochen
	37°C	zwei Tage
Wasser	4°C	vier Wochen
	25°C	vier Tage
Milch (pasteurisiert)	4°C	drei Wochen
	25°C	zwei Tage

Tab. 3: Überlebenszeit von *C. jejuni* in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Temperaturen (Blaser et al., 1980)

Das Kälteempfinden von *C. jejuni* ist stammspezifisch, und so können Temperaturen von +4°C und -20°C unterschiedlich lang toleriert werden. Dabei blieben einige Isolate spiralförmig, während andere kokkoid wurden, wobei die Zellmorphologie aber nicht in Beziehung zur Lebensfähigkeit stand (Chan et al., 2001).

Bei Gefriertemperaturen kommt es zur starken Reduktion der Keimzahl, *Campylobacter* spp. können aber einige Monate überleben (Bhaduri und Cottrell, 2004; Aho and Hirn, 1988; Altmeyer et al., 1985). Bei Hähnchenfleisch dient vor allem die Haut als Rückzugsgebiet für *Campylobacter* spp. Wurde Hähnchenfleisch ohne Haut bei -20°C eingefroren, konnten im Gegensatz zu Hähnchenfleisch mit Haut *Campylobacter* spp. nicht isoliert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Haut durch ihre Struktur (Falten, Federfollikel) und ihre Bestandteile (Proteine, Fettsäuren, Öl) als Schutz vor Gefrierschäden fungiert (Lee et al., 1998).

Gegenüber Hitze sind *Campylobacter* spp. empfindlich und überleben die gewöhnlichen Pasteurisierungsbehandlungen nicht. So betragen die D- Werte für Magermilch bei 55°C 0,74-1,0 min; für Fleisch bei 60°C weniger als 1 min (Jacobs-Reitsma, 2000; Blankenship and Craven, 1982).

2.2.5.2 Wasseraktivität

Campylobacter spp. benötigen zum Überleben ausreichend Feuchtigkeit. Der optimale a_w - Wert liegt bei 0,997 (Anonymus, 1998). *Campylobacter* spp. sind nicht fähig, bei trockenen Bedingungen zu überleben, auf trockenen Fleischoberflächen sterben sie

schnell ab (Arwana, 1987). In einem Modellversuch überlebte *C. jejuni* auf Eischalenoberflächen bei relativen Luftfeuchten von 78-80% länger als bei relativen Luftfeuchten von 50-55% vor allem bei Kühlschranktemperaturen (7-9°C) im Vergleich zu Raumtemperaturen (22-24°C) (Kollowa und Kollowa, 1989).

2.2.5.3 pH- Wert

Für thermophile *Campylobacter* spp. liegen die optimalen pH- Werte zwischen 6,5 und 7,5. Werte bis 4,9 bzw. 9 werden noch toleriert (Anonymus, 1998). Bei einem pH- Wert von 3 ergab sich für *Campylobacter* spp. eine $2\log_{10}$ - Keimzahlreduktion in 30 min, und bei einem pH- Wert von 2,3 fand eine $7\log_{10}$ - Keimzahlreduktion innerhalb von 5 min statt (Blaser et al., 1980).

2.2.5.4 NaCl- Konzentrationen

Bei 42°C beträgt die optimale Salzkonzentration für *Campylobacter* spp. 0,5% (Anonymus, 1998). *C. jejuni* wuchs noch bei 1,5% aber nicht mehr bei 2%. NARTC wuchsen hingegen noch bei 2% und tolerierten auch Werte von 4,5%. In der Abwesenheit von NaCl war nur ein schwaches Wachstum zu verzeichnen. Temperaturen von 4°C und 25°C erhöhten die Salzempfindlichkeit (Doyle and Roman, 1982b).

2.2.5.5 Atmosphäre

Die optimale Atmosphäre für thermophile *Campylobacter* spp. setzt sich aus 5% O₂, 10% CO₂ und 85% N₂ zusammen. Steigende Sauerstoffkonzentrationen reduzieren die Überlebenszeit (Buswell et al., 1998). Durch zelleigene Enzyme wie die Superoxid-Dismutase, die Endonuklease IV, die Katalase, die Alkyl- Hydroperoxid- Reduktase und verschiedene Oxidoreduktasen besteht ein gewisser Schutz gegenüber Superoxiden und Peroxiden (Sampathkumar et al., 2006).

2.2.5.6 Strahlung

Campylobacter spp. sind empfindlich gegenüber UV- und γ - Strahlung. So waren *Campylobacter* spp. in Oberflächenwasser nach 30-60 minütiger Bestrahlung mit künstlichem Sonnenlicht nicht mehr kultivierbar (Obiri- Danso et al., 2001). Die D- Werte für γ - Strahlung lagen für Rind- und Geflügelfleisch zwischen 0,12 und 0,25 kGy (Patterson, 1995; Tarkowski et al., 1984). So führte eine Bestrahlungsdosis von 1 kGy zu einer Keimzahlreduktion an *Campylobacter* spp. um 4 bis 8 \log_{10} - Einheiten. Lee et al. (1995) zeigten, dass eine Kombination von niedrig dosierter Strahlung mit modifizierten Verpackungsatmosphären eine effektive Keimreduktion bewirkte.

2.2.5.7 Desinfektionsmittel

Verschiedene Desinfektionsmittel sind in gängigen Konzentrationen effektiv in der Abtötung von *Campylobacter* spp. Phenolverbindungen (0,15%), Iodophore (10 mg/L), Quarternäre Stickstoffverbindungen (1:50.000), 70%iger Alkohol und Glutaraldehydlösungen (0,125%) sind fähig, *Campylobacter*- Konzentrationen von $7\log_{10}$ KbE/ml innerhalb von einer Minute zu inaktivieren. Nach 30 Minuten zeigten Formalinlösungen (1,25%) ihre keimtötende Wirkung. Hypochlorit in einer Konzentration von 1,25 mg/L bzw. 5 mg/L inaktivierte $4\log_{10}$ KbE/ml bzw. $7\log_{10}$ KbE/ml in 1 min bzw. 15 min (Wang et al., 1983). Chlor- (0,1 mg/L) und Monochloramin- (1 mg/L) Lösungen bewirkten eine 99%ige Abtötung von *C. jejuni* innerhalb von 5 bzw. 15 min. Dabei erfolgte die Inaktivierung bei einem pH- Wert von 6 und 25°C schneller als bei einem pH- Wert von 8 und 4°C (Blaser et al., 1986).

2.2.5.8 Druck

Ein Druck von ≤ 400 MPa für 19 min bei 25°C war in der Lage, *C. jejuni* in Milch und Kartoffelpüree zu inaktivieren (Solomon and Hoover, 2004). Dabei variierte die Druckresistenz beträchtlich zwischen den *Campylobacter*- Spezies und zwischen Stämmen einer Spezies. Das Überleben nach Druckeinwirkung war ebenfalls von Kulturalter und Foodmatrix abhängig. So war *C. fetus* druckempfindlicher als *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*, und Milch zeigte eine bessere Schutzwirkung gegenüber Druckeinwirkungen als Wasser (Martinez- Rodriguez and Mackey, 2005).

2.3 Kultivierung und Isolierung

2.3.1 Transportmedien

Verschiedene Schwierigkeiten ergeben sich beim Transport von *Campylobacter* spp.: sie sind empfindlich gegenüber Sauerstoff, Austrocknung, Temperaturen unter 30°C, pH- Werten unter 5 und über 9 sowie Salzkonzentrationen über 2%. Um die Lebensfähigkeit von *Campylobacter* spp. während des Transportes zu erhalten, können verschiedene Transportnährmedien eingesetzt werden (Aho et al., 1988). Bei Kühlung (4°C) ohne Benutzung eines Transportmediums ist eine Wiederfindung von *C. jejuni* aus Kotproben über drei Tage erfolgreich. Für Transporte von mehr als drei Tagen und für rektale Tupfer wird zum Schutz vor Austrocknung die Benutzung des Cary- Blair- Mediums empfohlen (Luechtefeld et al. 1981).

2.3.2 Anreicherungsmedien

Um bei geringen Keimzahlen oder geschädigten Zellen die Findungsrate zu erhöhen, werden Anreicherungsmedien wie z.B. Preston- Bouillon, Bolton- Bouillon oder Park and Sanders- Bouillon den Selektivnährmedien vorgeschaltet (Tab. 4). Bei durch Hitze oder Kälte geschädigten *C. jejuni* kann eine Voranreicherung für vier Stunden bei 37°C hilfreich sein (Humphrey, 1989).

Anreicherungsmedien

Doyle und Roman Bouillon (Doyle and Roman, 1982a)

Exeter Bouillon (De Boer and Hymphrey, 1991)

Hunt und Radle Bouillon (Hunt, 1992)

mCCD Bouillon (Bolton et al., 1984, mod. nach Hutchinson and Bolton, 1984)

Park und Sanders Bouillon (Park and Sanders, 1991)

Preston Bouillon (Bolton et al., 1982, Baird et al., 1987)

VTP FBP Bouillon (Lovett et al., 1983, mod. nach Park et al., 1981)

Tab. 4: Anreicherungsmedien für die Isolierung von *Campylobacter* spp. (nach Corry et al., 1995)

2.3.3 Selektivnährmedien

Durch die Entwicklung von Nährmedien mit Antibiotika- Zusatz konnten höhere Wiederfindungsraten durch eine starke Unterdrückung der Begleitflora erzielt werden. Der Vergleich von Nährmedien nach Karmali et al., Skirrow, Blaser et al., Fennell et al., Hutchinson & Bolton, Preston, Martin et al. sowie Butzler et al. zeigte, dass der Agar nach Karmali am besten für die *Campylobacter*- Diagnostik von Kotproben geeignet scheint. Er zeichnete sich durch eine starke Hemmung der Begleitflora aus, ohne das *Campylobacter*- Wachstum allzu stark zu unterdrücken. Im Allgemeinen war eine Supplementierung von 5 Gew.% Blut und 0,4 Gew.% Kohle optimal (Müller and Müller, 1997). Gun- Munro et al. (1987) zeigten ebenfalls die Überlegenheit von kohlehaltigen Nährmedien bei der Isolierung von *C. jejuni* aus Kotproben. Bei vorgeschädigten Zellen und/oder Antibiotika- empfindlichen Keimen sollten jedoch Nährmedien ohne das bestimmte Antibiotika oder die Membranfiltrationsmethode benutzt werden. In der Tabelle 5 sind einige Selektivnährmedien für die Isolierung von *Campylobacter* spp. dargestellt.

Selektivnährmedien

Blaser- Wang (Blaser et al., 1980)

Butzler (Lauwers et al., 1978)

Campy PAP (Blaser et al., 1978)

Karmali- Agar (Karmali et al., 1986)

mCCD- Agar (Bolton et al., 1984, mod. nach Hutchinson and Bolton, 1984)

Preston- Agar (Bolton and Robertson 1982, Baird et al. 1987)

Skirrow (Skirrow, 1977, Baird et al., 1987)

Tab. 5: Selektivnährmedien für die Isolierung von *Campylobacter* spp. (nach Corry et al., 1995)

2.3.4 Membranfiltrationsmethode

Diese Methode eignet sich zur Isolierung von (Antibiotika- sensiblen) *Campylobacter* spp. aus keimreichen Probenmaterialien ohne die Benutzung von selektiven Nährmedien. Von einer mit Kochsalzlösung oder sterilem Wasser aufgeschwemmten Probe werden einige Tropfen auf einen Filter (Porengröße 0,45-0,65 µm, Durchmesser 30-90 mm), der auf einem nicht selektiven, bluthaltigen Nährboden aufliegt, aufgebracht. Nachdem die Probenflüssigkeit den Filter passiert hat (ca. 30 min), wird der Filter entfernt und die Probe entsprechend inkubiert (Steele and McDermott, 1984).

2.3.5 Atmosphäre

Campylobacter spp. sind mikroaerophil, d.h. sie bevorzugen eine mit Kohlendioxid angereicherte Atmosphäre mit einer niedrigen Sauerstoffkonzentration. Im Allgemeinen wird eine Atmosphäre mit 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ verwendet. Einige Spezies wachsen sogar in anaerober Atmosphäre und brauchen Wasserstoff. *Campylobacter*-Stämme wuchsen in Hirn- Herz- Bouillon ohne Benutzung mikroaerober Kits über 40 Passagen genauso gut wie unter mikroaeroben Bedingungen ohne Unterschiede in der Wachstumsrate, dem Proteinprofil oder der Substratverwertung (Mohammed et al., 2005). *Campylobacter* spp. wachsen relativ langsam bei Temperaturen von 30-37°C, wobei einzelne Spezies auch Temperaturen von 25°C oder bis zu 43°C vertragen.

2.4 Identifizierung und Differenzierung

Campylobacter spp. sind extrem variabel im Phänotyp und im Genotyp. Zur Identifizierung und Differenzierung unterscheidet man zwischen phänotypischen und genotypischen Methoden. Die phänotypischen Methoden sind einfach in der Anwendung. Nachteile ergeben sich jedoch durch die Abhängigkeit von der Expression der phänotypischen Merkmale, die z.B. durch die Kulturbedingungen und das Alter der Kultur beeinflusst werden können, und dass ein relativ hoher Prozentsatz an Stämmen, aufgrund der fehlenden Expression eines phänotypischen Merkmals, nicht typisiert werden kann. Demnach ist die Phänotypisierung nicht immer die optimale Methode zur Differenzierung. Bei der Genotypisierung kann man davon ausgehen, dass die Genotypen vergleichsweise stabil und unabhängig von Kulturbedingungen oder der Expression von Antigenen sind (Wassenaar, 2000).

2.4.1 Phänotypische Methoden

Die phänotypischen Methoden beruhen auf dem Nachweis von biochemischen Reaktionen, serologischen Reaktionen oder speziellen Eigenschaften gegen Bakteriophagen. An dieser Stelle sei auf die biochemische und serologische Typisierung eingegangen, da sie noch relativ häufig zum Einsatz kommen.

2.4.1.1 Biochemische Typisierung

Die biochemische Typisierung ist eine einfache Methode und wird noch häufig eingesetzt. Aufgrund der zum Teil nicht deutlich ausgeprägten Eigenschaften wird die Typisierung jedoch erschwert. So beschrieben verschiedene Autoren falsch- positive bzw. falsch- negative *C. jejuni*- und *C. coli*- Stämme bei der biochemischen Testung, die durch PCR erkannt wurden (Rönner et al., 2004; Siemer et al., 2004; Hein et al., 2003; Rautelin et al., 1999; Totten et al., 1987). Persson and Olsen (2005) hingegen berichteten von der Übereinstimmung von biochemischen und PCR- Ergebnissen. Vacher et al. (2005) bestätigten ebenfalls die Gleichwertigkeit beider Methoden in der Speziesidentifizierung, lediglich ein *C. coli*- Stamm konnte mit der PCR nicht bestimmt werden.

Auch das Heranziehen der Antibiotikaempfindlichkeit auf Nalidixinsäure zur *Campylobacter*- Differenzierung ist aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber diesem Antibiotikum nicht mehr haltbar (EFSA, 2006).

2.4.1.2 Serotypisierung

Die Serotypisierung erfolgt durch den Nachweis von Oberflächenantigenen. Das Penner- Serotyping- System beruht dabei auf dem Nachweis von hitzestabilen Antigenen durch passive Hämagglutination (Penner und Hennessy, 1980). Das Lior- Serotypen- System weist hitzelabile Antigene durch bakterielle Agglutination nach (Lior et al., 1982). Das Penner- Typisierungsschema wird noch angewandt (Kopkins et al., 2004; Siemer et al., 2004; Dingle et al., 2002; Manning et al., 2001; Petersen and Wedderkopp, 2001). Nachteile der Serotypisierung sind das Bereithalten von vielen Antiseren und eine große Anzahl an nicht typisierbaren *Campylobacter*- Stämmen (Wassenaar and Newell, 2000). Dass gleiche Serotypen verschiedene Genotypen beherbergen, zeigt das mangelnde Differenzierungspotential dieser Methode und erfordert zur besseren Stammidentifizierung das Hinzuziehen von genotypischen Analysen (Siemer et al., 2005; Hopkins et al., 2004; Desai et al., 2001; Hänninen et al., 2001).

2.4.2 Genotypische Methoden

2.4.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist ein schnelles Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. Dabei wird ein spezifisches DNA- Fragment durch den Gebrauch von Primern (Oligonukleotiden) und einer thermostabilen DNA- Polymerase vervielfältigt (Wassenaar, 2000).

Häufig nachgewiesene *Campylobacter*- Gensequenzen für die Gattungsbestimmung sind 16S rRNA, 23S rRNA und das GTPase- Gen. Zur Identifizierung von *C. jejuni* werden das Hippurikase- Gen *hipO* (Dingle et al., 2005; Persson and Olsen, 2005; LaGier et al., 2004; Hein et al., 2003) oder das „membran- associated- protein“- Gen *mapA* (Denis et al., 2001) nachgewiesen. Bei *C. coli* sind es das Serin- Hydroxymethyl- Transferase- Gen *glyA* (Dingle et al., 2005; LaGier et al., 2004) oder das „enterocholin- uptake- periplasmic- binding- protein“- Gen *ceuE* (Denis et al., 2001). Auch bei *C. lari* und *C. upsaliensis* werden *glyA*- Gene detektiert. Bei *C. fetus* ssp. *fetus* wird das Oberflächen- layer- Protein- Gen *sapB2* nachgewiesen (Wang et al., 2002).

Um verschiedene *Campylobacter*- Spezies gleichzeitig nachzuweisen, wurden Multiplex- PCRs entwickelt (Persson and Olsen, 2005; LaGier et al., 2004; Wang et al., 2002), und neue Real- time PCRs mit oder ohne Anreicherungsschritt ermöglichen einen noch schnelleren Nachweis (<2 Stunden) von geringen Keimzahlen (ab 1 KbE)

mit quantitativer Bestimmung (Oliveira et al., 2005; Vacher et al., 2005; Yang et al., 2003).

Verschiedene Studien zeigten, dass der direkte Nachweis von *Campylobacter* spp. aus dem Ursprungsmaterial mittels PCR alle Positivbefunde, die durch die kulturelle Methode identifiziert wurden, erkannte. Ein geringer Prozentsatz wurde nach positiver PCR als falsch- negativ betrachtet (Mateo et al., 2005; Yang et al., 2003). Dabei gilt es zu beachten, dass beim Nachweis von *Campylobacter* spp. aus dem Ursprungsmaterial durch PCR neben lebenden und kultivierbaren Zellen auch lebende nicht kultivierbare (VBNC) und tote Zellen nachgewiesen werden. Die toten Keime stellen kein Risiko für den Menschen dar, weisen aber auf eine vorangegangene Kontamination hin. Wolffs et al. (2005) zeigten, dass mit Hilfe einer der Real- time PCR vorgelagerten Flotation die toten Zellen oder ihre DNA der PCR entgingen.

2.4.2.2 Flagellin- Typing (*fla*- Typing)

Diese Methode beinhaltet die Amplifikation der Flagellin- Gene (*flaA*, *flaB*) durch PCR und im Anschluss die Digestion der PCR- Produkte mit *fla*- spezifischen Restriktionsenzymen (*AluI*, *DdeI*, *HinfI*). Man erhält so Muster mit Fragmenten in einer Größenordnung von 0,01-1 kbp (Ishihara, 2006; Rivoal et al., 2005; Petersen and Wedderkopp, 2001; Manning et al., 2001; de Boer et al., 2000; Lindstedt et al., 2000; Wassenaar, 2000). Der häufige Austausch der *fla*- Gene zwischen den Spezies macht diese Methode ungeeignet für die Speziesdifferenzierung, aber nützlich für die Unterscheidung eng verwandter Stämme (Dingle et al., 2005; Duim et al., 2003).

Das *fla*- Typing ist eine preiswerte, schnelle und einfache Methode. Das Risiko möglicher Rekombinationen der *fla*- Gene und der Mangel der Speziesdifferenzierung wirken sich jedoch nachteilig aus (de Boer et al., 2000).

2.4.2.3 Ribotyping

Ribosomale Gen- Loci (5S, 16S und 23S rRNA) werden durch PCR amplifiziert. Die gewonnenen Fragmente sind 0,1-5 kbp groß und die Auflösung der Gele ist schlechter als die der Gele für *fla*- typing. Da die meisten *Campylobacter* spp. nur drei ribosomale Gen- Loci enthalten, ist die Diskriminierungskraft begrenzt (Wassenaar, 2000; Payne et al., 1999). Durch die Verdauung mit Restriktionsenzymen (*AluI*, *HhaI*, *PstI*, *Tsp509I*) erhält man Ribotype- Muster mit wenigen Banden (Rönner et al., 2004; Duim et al., 2003; de Boer et al., 2000).

Ribotyping hat den Vorteil des automatisierten hohen Durchsatzes, ist aber teuer und hat ein geringes Differenzierungspotential (de Boer et al., 2000).

2.4.2.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Es werden keine spezifischen Gen- Loci amplifiziert, sondern durch den Einsatz von arbiträren Primern werden zufällig verteilte Fragmente erzeugt. Nachteil dieser Methode ist der Mangel an Reproduzierbarkeit (Wassenaar, 2000).

2.4.2.5 Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE)

Die PFGE basiert auf der An- oder Abwesenheit von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme, die mit niedriger Häufigkeit im Genom schneiden und Fragmente in der Größenordnung von 20-200 kbp herauschneiden, welche auf Agarose- Gelen durch ein pulsierendes elektrisches Feld aufgetrennt werden. Dabei hängt das entstandene Bandenmuster von der Wahl der Enzyme und den elektrophoretischen Bedingungen ab (Wassenaar, 2000).

Um die DNA vor Brüchen zu schützen, wird die bakterielle Suspension in Agaroseblöckchen immobilisiert, bevor die Zellen lysiert werden. Auch alle folgenden enzymatischen Schritte werden mit den in den Agaroseblöckchen festgehaltenen Proben durchgeführt (Wassenaar and Newell, 2000). Der Einsatz von zwei Restriktionsenzymen ist sinnvoll für eine bessere Diskriminierung, denn *Campylobacter* spp. zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei Anwendung verschiedener Endonukleasen. Als Restriktionsenzyme werden meist *KpnI* und *SmaI* zusammen oder einzeln eingesetzt (Cardinale et al., 2006; Ishihara et al., 2006; Höök et al., 2005; Duim et al., 2003; Michaud et al., 2001; de Boer et al., 2000; Wassenaar et al., 1998). Es werden aber auch andere Enzymkombinationen wie *SmaI/SaI* (Hein et al., 2003) und *SmaI/KpnI/BamHI* (Manning et al., 2001; Petersen and Wedderkopp, 2001) benutzt.

Bei der Interpretation nach Tenover et al. (1995) wird zwischen vier Verwandtschaftsgraden unterschieden. Hierfür müssen jedoch Muster mit mindestens zehn Fragmenten vorliegen. Ausbruchisolate zeigen eine vollständige Übereinstimmung in Fragmentanzahl und Fragmentgrößen. Eng verwandte Isolate unterscheiden sich durch eine genetische Veränderung (Punktmutation, Insertion, Deletion) in 2-3 Fragmenten. Bei wahrscheinlich verwandten Isolaten zeigen sich aufgrund von zwei genetischen Veränderungen Unterschiede in 4-6 Fragmenten. Genetisch verschiedene Isolate differieren schließlich in mehr als sechs Fragmenten aufgrund von mehreren genetischen Vorkommnissen.

Die PFGE- Methode ist zeitaufwendig und für große Probenmengen nicht geeignet. Von Nachteil ist auch die begrenzte Diskriminierungsfähigkeit bei PFGE- Mustern mit geringer Fragmentanzahl (de Boer et al., 2000).

2.4.2.6 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Diese Methode benötigt reine, doppelsträngige DNA, wobei aber kleine Mengen (10-100 ng) ausreichend sind. Zuerst wird die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut, und anschließend wird ein Teil der Fragmente durch PCR amplifiziert.

Isolierte chromosomale DNA wird mit zwei Restriktionsenzymen, eines mit einer niedrigen Schneidfrequenz und eines, das relativ häufig schneidet, verdaut. Das erstere weist eine 6 bp (six cutter) und das zweite eine 4 bp (four cutter) große Erkennungssequenz auf. Danach erfolgt die Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotid-Adaptoren, die so geschaffen sind, dass die ursprüngliche Restriktionsstelle nach Ligation nicht wieder freigegeben wird. So können Restriktion und Ligation gleichzeitig ablaufen. Ein Teil der Fragmente, die 50-500 bp groß sind, wird mittels PCR amplifiziert. Hierzu werden adapter-spezifische Primer, die an ihrem 3'-Ende einen Zusatz von ein bis drei Nukleotiden aufweisen können, eingesetzt. Durch Zusatz von einem Nukleotid wird etwa jedes vierte ligierte Fragment, beim Zusatz von zwei Nukleotiden jedes 256. und durch Zusatz von drei Nukleotiden nur jedes 4096. Fragment amplifiziert. Somit können Muster mit einer auswertbaren Anzahl an Fragmenten entstehen. Die präselektive PCR begrenzt die Anzahl für die nachfolgende selektive PCR, bei der Primer benutzt werden, die weitere Nukleotide an ihrem 3'-Ende aufweisen, aber ansonsten die gleiche Sequenz wie die präselektiven Primer haben. Die gewonnenen Fragmente werden auf Acrylamid-Gelen mit hoher Auflösung analysiert (40-200 Banden). So entstandene Muster können durch radioaktiv markierte Primer, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Oligonukleotiden oder durch Färbung der Gele mit Ethidiumbromid oder mit Silber dargestellt werden. Die Gele werden dann mit Hilfe eines automatischen Sequenzers oder unter UV- bzw. Weißlicht ausgewertet.

Für *Campylobacter* spp. wurden die besten Ergebnisse mit den Endonukleasen *HindIII* und *HhaI* unter Verwendung der Primer Hind/HindA und Hha/HhaA erreicht. Die AFLP-Muster enthielten dann 40-50 Banden, bei *C. mucosalis* und *C. sputorum* waren es jedoch nur 11-25 Banden. Die Verwendung eines weiteren Nukleotids bei den selektiven Primern (HindA und HhaAT) reduzierte die Bandenzahl auf 20-30 und senkte damit die Diskriminierungskraft. Eine Restriktion mit *EcoRI* und *MseI* erzeugte zu viele kleine Fragmente, und die Verdauung mit *TaqI* war unvollständig. Trotz Standardisierung waren geringe Unterschiede der Fingerprints identischer Proben vorhanden, was vermutlich auf Effizienzunterschiede der PCR-Amplifikation und den Gelvariationen zurückzuführen war. Aus diesem Grunde sollten 2-10% der „Geräusche“ ignoriert werden (Duim et al., 2003; Duim et al., 1999).

Die Typisierung und Identifizierung kann durch Definition von Ähnlichkeitswerten standardisiert werden, z.B. werden Muster mit 90-100% Homologie als identische Stämme betrachtet, Muster mit 60-90% Übereinstimmung deuten auf verschiedene Stämme von der gleichen Spezies, während eine Übereinstimmung von 40-60% bei Isolaten von verschiedenen Spezies aber der gleichen Gattung vorzufinden ist, und eine Übereinstimmung von weniger als 40% für Isolate von verschiedenen Gattungen spricht (Savelkoul et al., 1999). Duim et al. (1999) zeigten jedoch, dass auch zwischen verschiedenen *Campylobacter*- Spezies Ähnlichkeiten von nur 22% vorkamen.

Die AFLP- Analyse zeichnet sich durch exzellente Typisierbarkeit sowie ein hohes Differenzierungsvermögen aus und kann zur Klärung von epidemiologischen Fragestellungen eingesetzt werden (Duim et al., 2001; On and Harrington, 2000; Wassenaar, 2000; Savelkoul et al., 1999).

2.4.2.7 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Bei dieser Methode werden verschiedene Gensequenzen von Haushaltsgenen, wie z.B. *aspA* (Aspartase), *glnA* (Glutamin- Synthetase), *gltA* (Citrat- Synthetase), *glyA* (Serin- Hydroxymethyl- Transferase), *pgm* (Phosphogluco- Mutase), *tkt* (Transketolase) und *uncA* (ATP- Synthase Untereinheit) analysiert (Dingle et al., 2005; Colles et al., 2003; Duim et al., 2003; Dingle et al., 2001). Dabei zeigten *C. jejuni*- und *C. coli*- Stämme eine 86,5%ige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz innerhalb der MLST- Loci (Dingle et al., 2005). Für die beiden Spezies konnte ein Austausch der Haushaltsgene nachgewiesen werden (Dingle et al., 2005; Dingle et al., 2001).

Neben *C. jejuni* und *C. coli* werden bereits auch *C. lari*, *C. helveticus* und *C. upsaliensis* mit der MLST- Analyse differenziert, wobei die oben genannten sieben Genloci bei *C. lari* und *C. upsaliensis* teilweise ausgetauscht werden (*adk* (Adenylat- Kinase) und *pgi* (Glukose- 6- Phosphat- Isomerase) gegen *aspA* und *gltA* bzw. *gltA* und *pgm*) (Miller et al., 2005). Daneben können noch andere Genloci wie *ilvD* (Dihydroxy- Acid- Dehydratase) und *mdh* (Malat- Dehydrogenase) analysiert werden (Manning et al., 2003).

Diese Methode ist bestens geeignet, um genetische Beziehungen verschiedener Linien und Klone zu bestimmen, für epidemiologische Studien ist sie jedoch nicht optimal (Wassenaar, 2000). Duim et al. (2003) und Dingle et al. (2002) dagegen sprachen sich für eine Nutzung der MLST für epidemiologische Studien aus.

2.4.2.8 Clustered Regularly Interspaced Short Palindrom Repeats (CRISPR)

Hierbei werden Sequenzen von Genomregionen mit kurzen Tandem- Wiederholungen analysiert. Sie hat eine vergleichbare Diskriminierungskraft wie AFLP und MLST, doch bleiben einige Stämme aufgrund des Vorkommens von nur einer einzelnen sich wiederholenden Sequenz oder des Mangels von durch CRISPR amplifizierbaren Genloci nicht typisierbar. So ist diese Methode nur für die Subtypisierung von Stämmen mit gleichen AFLP- oder MLST- Profilen nützlich (Schouls et al., 2003).

2.4.3 Vergleich der Methoden

Zur Identifizierung mögen Methoden, die einen oder wenige Genloci nachweisen wie PCR und *fla*- Typing, ausreichend sein. Zur Klärung epidemiologischer Fragestellungen sind sie jedoch nicht geeignet, da Muster und Änderungen im restlichen Genom nicht erfasst werden. Hierfür bieten sich die RAPD- Methode, die PFGE, die AFLP- Analyse und die MLST an, die das gesamte Genom oder mehrere Genloci betrachten. Aufgrund des Mangels an Reproduzierbarkeit sollten die PFGE, die MLST und die AFLP- Methode der RAPD- Analyse vorgezogen werden. Duim et al. (2003) zeigten, dass MLST, PFGE, AFLP- Analyse und Ribotyping für die epidemiologische Typisierung gleichwertig sind. Die PFGE hat ein gutes Differenzierungspotential, ist aber zeitaufwendig und für große Probenmengen ungeeignet (de Boer et al., 2000). Zudem erfüllen die Fragmentmuster, insbesondere wenn sie nur mit einem Enzym geschnitten werden, nicht immer die Tenover- Kriterien. Die AFLP- Analyse ist hoch diskriminierend, weniger zeitaufwendig als die PFGE und geeignet für die Bearbeitung von großen Probenmengen (de Boer et al., 2000). Auch wenn identische AFLP- Muster durch die PFGE weiter differenziert werden können, ist die AFLP- Analyse doch häufiger in der Lage, identische PFGE- Muster zu differenzieren (Hein et al., 2003; Hänninen et al., 2001; de Boer et al., 2000; Lindstedt et al., 2000). Die AFLP- Methode ist kostengünstiger, schneller und einfacher umzusetzen als die MLST. Der Vergleich von AFLP- Mustern mit anderen Laboren gestaltet sich jedoch schwierig (Schouls et al., 2003). Die MLST hat den Vorteil der Kompatibilität, der Reproduzierbarkeit und der vereinheitlichten Nomenklatur, was einen Vergleich zwischen Studien ermöglicht (Duim et al., 2003, Schouls et al., 2003).

In epidemiologischen Studien ist die Kombination von zwei Genotypisierungsmethoden oder die Verbindung von Phäno- und Genotypisierung sinnvoll (Ishihara et al., 2006; Hänninen et al., 2001; de Boer et al., 2000; Wassenaar, 2000). Laut O'reilly et al. (2006) ist die Kombination von *fla*- Typing oder Ribotyping mit der MLST bestens geeignet.

2.5 Antibiotika- Resistenz

2.5.1 Allgemeines

Antibiotika sind bestimmte Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, Streptomyceten oder Bakterien und deren (semi-) synthetische Derivate mit bakteriostatischer oder bakterizider Wirkung (Pschyrembel, 1994). Dabei sind folgende Wirkungsmechanismen möglich: Störung der Zellwandsynthese, Steigerung der Zellmembranpermeabilität, Hemmung von Stoffwechselfvorgängen, Störung des Nucleinsäurestoffwechsels und Hemmung der Proteinsynthese. Das Wirkungsspektrum kann dabei eng oder breit sein.

Bakterien können natürliche oder erworbene Resistenzen aufweisen. Die Resistenzmechanismen sind dabei vielfältig und reichen von der Inaktivierung des Antibiotikums über eine verminderte Affinität des Antibiotikums zum Zielmolekül, eine verminderte Konzentration des Antibiotikums am Wirkort bis zum Bestreiten von alternativen Stoffwechselwegen.

2.5.2 Aminoglykosid- Resistenz

Aminoglykoside sind gewöhnlich bakterizid. Sie binden irreversibel an Ribosome und hemmen damit die Proteinsynthese.

Aminoglykosid- Resistenzen werden häufiger bei *C. coli* als bei *C. jejuni* angetroffen (Trieber and Taylor, 2000). Die Mehrzahl der Resistenzen ist plasmid- kodiert, aber auch chromosomal- kodierte Resistenzen kommen vor. Die Resistenzmechanismen beruhen auf der Modifikation der Antibiotika, so dass diese nicht mehr mit den Ribosomen interagieren können. Aminoglykosid- Phospho- Transferasen (APH), Aminoglykosid- Adenylyl- Transferasen (AAD) und Aminoglykosid- Acetyl- Transferasen (AAC) bewirken diese Modifikationen (Gibreel et al., 2004a). Zusätzlich könnten Mutationen der ribosomalen Proteine und der rRNA mit nachfolgender Reduktion der Affinität der Antibiotika zu den Ribosomen für ein Resistenzverhalten verantwortlich sein (Trieber and Taylor, 2000).

2.5.3 β - Laktam- Resistenz

β - Laktame sind bakterizid und greifen in die Murein- Synthese ein, indem sie an periplasmatische Proteine (Carboxypeptidasen, Transpeptidasen) binden und somit einen korrekten Zellwandaufbau bei gram- positiven und gram- negativen Bakterien verhindern. Durch den steigenden osmotischen Druck lysieren die Bakterien schließlich.

Viele *C. jejuni*- und *C. coli*- Stämme produzieren β - Laktamase, jedoch konnte kein direkter Nachweis zeigen, dass dies der Resistenzmechanismus gegen die meisten β -Laktame ist. Nur bei Ampicillin und Amoxicillin korrelierte die Anwesenheit von β -Laktamase mit höheren Resistenzwerten. Der Zusatz von β - Laktamase- Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam) kann die Aktivitäten von Amoxicillin und Ampicillin steigern oder hat nur einen geringen Einfluss. Ein Grund für die Resistenz gegen Penicillin, Piperacillin und Cephalosporinen ist eine verminderte Penetration ins Zellinnere. Das Verhalten von *Campylobacter* spp. gegenüber β - Laktamen ist abhängig vom Substrat. So sind viele *C. jejuni*- Stämme resistent gegenüber Penicillin, Piperacillin, Cephalothin, Cefazolin und anderen Cephalosporinen. Wenige Stämme sind gegen Ampicillin oder Amoxicillin und keine gegen Imipenem resistent. *C. coli*- Stämme scheinen empfindlicher gegenüber β - Laktame zu sein (Trieber and Taylor, 2000).

2.5.4 Chloramphenicol- Resistenz

Chloramphenicol ist ein Breitspektrum- Antibiotikum mit bakteriostatischer Aktivität gegen viele gram- positive und gram- negative Bakterien sowie gegen Rickettsien, Chlamydien und Mykoplasmen. Sie binden an Ribosome und hemmen dadurch die Peptidyltransferase.

Eine Chloramphenicol- Resistenz ist bei *Campylobacter* spp. selten. Sie rührt entweder von einer Mutation der 23S rRNA oder weit häufiger von einer Modifikation von Chloramphenicol durch die Chloramphenicol- Acetyl- Transferasen her. Die Acetylierung von Chloramphenicol verhindert eine Bindung an Ribosome (Trieber and Taylor, 2000).

2.5.5 (Fluoro-) Quinolon- Resistenz

Quinolone sind gegenüber den meisten gram- negativen und einigen gram- positiven Bakterien bakterizid. Durch Bildung eines Quinolon- Gyrase- DNA- Komplexes hemmen sie die DNA- Replikation und Transkription.

Die (Fluoro-) Quinolon- Resistenz ist meist chromosomal kodiert. Verschiedene Resistenz- Mechanismen werden beschrieben: Modifikation der DNA- Gyrase oder der Topoisomerase IV, eine reduzierte Permeabilität und Efflux. Bei *C. jejuni* und *C. coli* beruht die (Fluoro-) Quinolon- Resistenz auf einer Mutation der Gene, die Untereinheiten der DNA- Gyrase (*gyrA*) und der Topoisomerase IV (*parC*) kodieren (Trieber and Taylor, 2000). Dabei scheinen Mutationen im *gyrA* an den Positionen Thr86Ile, Asn203Ser, Ala206Thr, Asp90Asn und Thr86Ala ausschlaggebend zu sein (Cardinale et al., 2006; Ishihara et al., 2006; Jesse et al., 2006; Albert et al., 2005;

Corcoran et al., 2005; Griggs et al., 2005; Ge et al., 2003). High-level-Resistenzen gegenüber verschiedenen Quinolonen waren mit einer Thr86Ile-Mutation assoziiert (McIver et al., 2004). Laut Corcoran (2005) jedoch korrelierten die Thr86Ile-Modifikationen der GyrA nicht mit dem Grad der Quinolon-Resistenz. Stämme mit der Mutation Thr86Ile zeigten eine low-level-Resistenz gegenüber Ciprofloxacin und Nalidixinsäure. Stämme mit den Mutationen Thr86Ile und Asn203Ser zeigten eine high-level-Resistenz gegenüber diesen Antibiotika, was darauf deutet, dass noch andere Faktoren die Quinolonempfindlichkeit beeinflussen. Hohe Moxifloxacin-Resistenz-Werte waren ebenfalls mit einer Doppel-Mutation im *gyrA*-Gen verbunden (Ruiz et al., 2005).

2.5.6 Makrolid-Resistenz

Makrolide wirken bakteriostatisch gegenüber gram-positiven und einigen gram-negativen Bakterien sowie gegen Mykoplasmen, Rickettsien, Chlamydien und Treponema. Erythromycin hemmt die Proteinsynthese durch Bindung an Ribosome. Dabei scheint es eher eine Loslösung der Peptidyl-tRNA als eine Blockierung der Peptidyl-Transferase zu bewirken, ein Mechanismus der größeren Makrolide.

Erythromycin-Resistenzen sind chromosomal kodiert und kommen selten bei *Campylobacter* spp. vor. Bei *C. rectus* verhindert eine rRNA-Methylase durch Methylierung von Adenin in der 23S rRNA die Bindung von Erythromycin (Trieber and Taylor, 2000). Bei *C. jejuni* und *C. coli* scheint eine Alteration der Bindungsstelle am Ribosom verantwortlich zu sein. *Campylobacter* spp. zeigen zwei Phänotypen in der Erythromycin-Resistenz. Die high-level-Resistenz beinhaltet eine Transitions-Mutation in der 23S rRNA (innerhalb der Peptidyl-Transferase-Region in Domäne V), reagiert jedoch nicht auf den Efflux-Pump-Inhibitor PAßN (Phenylalanin-Arginin-beta-Naphthylamid). Die low-level-Resistenz weist keine Mutation der rRNA auf, beruht aber auf einem PAßN-empfindlichen Antibiotika-Transport (Alonso et al., 2005; Mamelli et al., 2005). Durch natürliche Transformation kann die Makrolid-Resistenz eines resistenten *Campylobacter*-Isolates auf ein empfindliches *Campylobacter*-Isolat übertragen werden (Gibreel et al., 2005).

2.5.7 Tetrazyklin-Resistenz

Tetrazykline wirken bakteriostatisch gegen eine Vielzahl an gram-positiven und gram-negativen Bakterien, aber auch gegen Rickettsien, Mykoplasmen, Chlamydien und protozoischen Parasiten. Sie agieren als Protein-Synthese-Inhibitoren. Nach aktiver Aufnahme in die Zelle binden sie an die 30S-Untereinheit der Ribosomen an einer

hoch- affinen Stelle und auch an mehreren niedrig- affinen Stellen beider Untereinheiten. Sie behindern dadurch direkt oder durch Konformationsänderung die Bindung von Aminoacyl- tRNA und Elongation und Proteinsynthese kommen zum Stillstand.

Die Resistenz gegenüber Tetrazyklin bedient sich folgender vier Mechanismen: Efflux von Tetrazyklin, Modifikation von Tetrazyklin, ribosomaler Schutz oder Mutation der 16S rRNA. Bei *Campylobacter* spp. ist sehr oft das lösliche Protein TetO (639 Aminosäuren, 72kDa) für die Resistenz verantwortlich. TetO zeigt eine starke Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz und Funktion zu ribosomalen Elongationsfaktoren und kann so das Ribosom vor der Blockierung durch Tetrazyklin schützen. Auch in anderen Bakterien wie *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus* spp. wurde das *tetO*- Gen auf Plasmiden isoliert. Während das *Campylobacter*- Genom einen G+C Anteil von ca. 33 mol% hat, weist die Nukleotidsequenz der *Campylobacter*- *tetO*- Gene einen G+C Anteil von 40 mol% auf, was dafür spricht, dass *Campylobacter* spp. ihr *tetO*- Gen von gram- positiven Bakterien erhielten (Trieber and Taylor, 2000). Die Tetrazyklin- Resistenz beruht in der Regel auf selbst übertragende Plasmide, die das *tetO*- Gen enthalten. Aber auch von chromosomal lokalisierten *tetO*- Genen wird berichtet (Pratt and Korolik, 2005; Gibreel et al., 2004b). Der schnelle und spontane *tetO*- Gen- Transfer könnte die hohe Prävalenz der Tetrazyklin- Resistenz erklären (Avrain et al., 2004).

2.5.8 Trimethoprim- Resistenz

Trimethoprim ist wirksam gegen viele gram- positive Kokken und die meisten gram- negativen Bakterien. Es hemmt die Dihydrofolat- Reduktase und damit die Bildung von Tetrahydrofolat, welches für die Aminosäure- und Nukleotid- Synthese benötigt wird.

Campylobacter spp. sind resistent gegenüber Trimethoprim, welches deshalb auch in verschiedenen Selektivnährmedien eingesetzt wird. Die beiden chromosomalen Gene *dfr1* und *dfr9* kodieren eine Trimethoprim- resistente Dihydrofolat- Reduktase. Da der G+C Anteil in den *dfr*- Genen höher ist als im übrigen *Campylobacter*- Chromosom, wird eine Herkunft von anderen resistenten Bakterienspezies vermutet (Trieber and Taylor, 2000).

2.5.9 Antibiotika- Resistenz- Prävalenzen

In verschiedenen Ländern wird von steigenden Fluoroquinolon- Resistenzen bei humanen und tierischen *Campylobacter*- Isolaten berichtet (EFSA, 2006; Cui et al., 2005; Gupta et al., 2004; Ibrahim et al., 2004; Ge et al., 2003; Krausse and Ullmann,

2003; Mirelis et al., 1999). Dänemark und Norwegen verzeichneten bei Masthähnchen und Hähnchenfleisch für Quinolone, Fluoroquinolone und Tetrazyklin niedrige Resistenzraten (EFSA, 2006). Der Rückgang der Fluoroquinolon- Resistenz bei *C. jejuni*- Isolaten aus Hähnchenfleisch in Dänemark ist eventuell auf den reduzierten Einsatz von Fluoroquinolonen bei lebensmittelliefernden Tieren zurückzuführen (Andersen et al. 2006). Der Anstieg der Antibiotika- Resistenzen und insbesondere der Fluoroquinolon- Resistenz bei den humanen Isolaten wird als Ergebnis des Einsatzes in der Humanmedizin und bei lebensmittelliefernden Tieren angesehen (Bartholomew et al., 2005; Wassenaar, 2005; Angulo et al., 2004). So wiesen konventionelle Hähnchenprodukte im Vergleich zu Antibiotika- freien Hähnchenprodukten eine hohe Prozentzahl an Fluoroquinolon- resistenten *Campylobacter*- Stämmen auf und hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit, resistente Stämme zu beinhalten (Soonthornchaikul et al., 2006; Price et al., 2005; Desmots et al., 2004; Frediani- Wolf and Stephan, 2003). Die Verabreichung von Fluoroquinolonen steigerte die Anzahl der Fluoroquinolon- resistenten *Campylobacter*- Stämme. Trotz Abwesenheit des selektiven Druckes (keine Fluoroquinolon- Verabreichung) persistierte die Fluoroquinolon- Resistenz bei konventionellen Produkten (Price et al., 2005). Cui et al. (2005) berichteten davon, dass *Campylobacter*- Isolate von Masthähnchen aus konventioneller Haltung mit 20% häufiger resistent gegenüber Ciprofloxacin waren als Isolate von Masthähnchen aus biologischer Haltung mit 5%.

Die Erythromycin- Resistenzraten waren bei *Campylobacter* spp. niedrig, vor allem bei *C. jejuni*. Bei *C. coli* kamen höhere Resistenzwerte vor (EFSA, 2006; Wittwer et al., 2005; Gupta et al., 2004; Ibrahim et al., 2004; Mirelis et al., 1999). Für Gentamicin waren die Resistenzraten für *C. jejuni* und *C. coli* gering (EFSA, 2006; Takayama et al., 2005; Wittwer et al., 2005; Mirelis et al., 1999). Die Tetrazyklin- Resistenz hingegen stieg bei *Campylobacter*- Stämmen an (EFSA, 2006; Cui et al., 2005; Gibreel et al., 2004b; Ge et al., 2003; Mirelis et al., 1999). In Litauen waren die Resistenzen für Tetrazyklin jedoch niedrig (EFSA, 2006). Eine Chloramphenicol- Resistenz war selten bei *Campylobacter* spp. (EFSA, 2006; Cui et al., 2005).

In Summe war *C. coli* resistenter als *C. jejuni* (EFSA, 2006; Takayama et al., 2005; Desmots et al., 2004; Ishihara et al., 2004; Ge et al., 2003; Pezzotti et al., 2003; Mirelis et al., 1999).

Unterschiede im Resistenzverhalten bei Puten-, Masthähnchen- und Humanstämmen unterstützen die Hypothese, dass einige Stämme, die Infektionen beim Menschen hervorrufen, einen anderen Ursprung als Geflügel haben (Ge et al., 2003; Luber et al. 2003b).

2.5.10 Methoden zur Resistenzbestimmung

2.5.10.1 Bouillon- Dilutionsmethode (Makro- oder Mikrodilution)

Beim Reihenverdünnungstest werden gleich bleibend hoch beimpfte Keimsuspensionen geometrisch zunehmenden Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. Durch Beurteilung des Trübungsgrades wird die minimale Hemmkonzentration (MHK), d.h. die niedrigste Wirkstoffkonzentration mit bakterizider bzw. bakteriostatischer Wirkung ermittelt.

2.5.10.2 Agar- Dilutionstest

Hier werden die Antibiotika- Verdünnungen in den Nährboden eingemischt und die Keimsuspension aufgetragen. Anhand des Wachstumsverhaltens wird die Antibiotikaempfindlichkeit bewertet.

2.5.10.3 Agar- Diffusionstest (Blättchentest)

Filterpapierblättchen mit definierter Antibiotika- Konzentration werden auf den mit Bakterien beimpften Nährboden gebracht und der Wirkstoff diffundiert in den Nährboden. Der Durchmesser des Hemmhofes im Bakterienrasen ist Maß für die Empfindlichkeit des Keimes.

2.5.10.4 E- Test

Beim E- Test entsteht um einen Teststreifen mit fortlaufendem Antibiotika- Konzentrationsgefälle eine parabelförmige Hemmzone auf dem beimpften Nährboden. Der Schnittpunkt dieser mit der MHK- Skala auf dem Teststreifen wird abgelesen. Durch das fortlaufende Konzentrationsgefälle auf dem Teststreifen liefert der E- Test mehr MHK- Werte als Tests mit geometrischen Verdünnungsstufen.

2.5.10.5 Vergleich der Methoden

Der häufig in der Routinediagnostik eingesetzte Agardiffusionstest ist im Vergleich zu den Dilutionsverfahren mit mehr Fehlermöglichkeiten behaftet. So beeinflussen Variationen im Inokulum, unterschiedliche Schichtdicken des Agars, das Alter der Agarplatten und Testblättchen sowie die Positionierung der Blättchen auf den Agar das Ergebnis. Vorteil der Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen ist die Beurteilung der therapeutischen Effizienz der Substanzen (Stock et al., 2001). Der Vergleich von Mikrodilutionstest mit dem Agar- Diffusionstest, dem Agar- Dilutionstest und dem E- Test zeigte, dass der Mikrodilutionstest als einfache und zeitsparende Methode, vor allem bei großem Probenumfang und einer Vielzahl an zu testenden Antibiotika, für *C. jejuni*- und *C. coli*- Stämme vergleichbare Ergebnisse liefert (Halbert et al., 2005; Frediani- Wolf and Stephan, 2003; Luber et al., 2003a).

2.6 Vorkommen und Bedeutung

2.6.1 Übersicht

Die meisten *Campylobacter* spp. sind pathogen und verursachen eine Vielzahl an Krankheitsbildern bei Mensch und Tier. Dabei nehmen die thermophilen *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*) eine bedeutende Rolle ein. Sie kommen bei verschiedenen Haus- und Wildtieren als Kommensalen vor, verursachen beim Menschen aber Krankheitsbilder. Als Hauptinfektionsquellen gelten Lebensmittel und der Kontakt zu Haustieren.

Die am häufigsten beim Menschen Durchfall verursachende *Campylobacter*- Spezies ist *C. jejuni* (EFSA, 2006; Gupta et al., 2004; Ibrahim et al., 2004). Dabei wird der Durchfall häufig von Bauchkrämpfen, Fieber und Blut im Stuhl begleitet. Die Erkrankung ist meist selbstlimitierend und dauert nur einige Tage. Nach *C. jejuni*-Infektionen treten aber auch Fälle von Septikämien, Endokarditiden, Meningitiden, Aborte und Spätkomplikationen wie die reaktive Arthritis und das Guillain- Barré-Syndrom auf. Unzureichend erhitztes Geflügelfleisch stellt neben Rohmilch oder nicht ausreichend erhitzter Milch die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar (RKI, 2000; Thurm et al., 2000; Thurm und Dinger, 1998; Loewenherz- Lüning et al., 1996). Daneben ist aber auch eine Infektion durch Kontakt zu Heim- und Haustieren (Ali et al., 2003) sowie durch kontaminiertes Trink- und Oberflächenwasser (Horman et al., 2004; Nygard et al., 2004; Schonberg- Norio et al., 2004) möglich.

C. coli ist die zweithäufigste beim Menschen Durchfall erregende *Campylobacter*-Spezies, verursacht jedoch auch Septikämien und Aborte. Er kommt v.a. bei Schweinen vor (Boes et al., 2005; Thakur and Gebreyes, 2005; Botteldoorn et al., 2001), ist aber auch bei Geflügel, Wildvögeln, Hunden und Katzen vorzufinden (EFSA, 2006; Aboaba and Smith, 2005; Padungtod and Kaneene, 2005; Workman et al., 2005; Glünder et al., 1991).

C. lari löst beim Menschen ebenfalls Gastroenteritiden und Septikämien aus. Dieser Keim kommt in Möwen, Hühnern, Seetieren sowie in Gewässern vor (Brown et al., 2004; Anonymus, 2002).

Auch *C. concisus* ist als Durchfallerreger bekannt (Aabenhus et al., 2005; Engberg et al., 2005). Daneben ist er in der Mundhöhle vorzufinden (Anonymus, 2002; Macuch and Tanner, 2000).

C. curvus wird mit peridontalen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Nur selten wird er bei Diarrhoe- und Septikämie- Fällen beschrieben (Abbott et al. 2005; Anonymus, 2002).

C. fetus ssp. *fetus* verursacht bei Rindern und Schafen Aborte. *C. fetus* ssp. *venerealis* verursacht Unfruchtbarkeit. Beim Menschen werden *C. fetus* ssp. *fetus* neben Durchfällen, Septikämien und Meningitiden ebenfalls Aborte zugeschrieben (Anonymus, 2002).

C. gracilis wird in der Mundhöhle und bei Infektionen des tiefen Gewebes vorgefunden (Anonymus, 2002; Macuch and Tanner, 2000).

C. helveticus kommt sowohl bei gesunden als auch bei an Durchfall erkrankten Hunden und Katzen vor (Wieland et al. 2005; Anonymus, 2002).

C. hyointestinalis ssp. *hyointestinalis* wird aus gesunden und an Durchfall erkrankten Rindern und Schweinen isoliert, und führt auch beim Menschen zu Diarrhoe (Brown et al., 2004; Anonymus, 2002). *C. hyointestinalis* ssp. *lawsonii* kommt ebenfalls beim Schwein vor (Anonymus, 2002).

C. lanienae wurde im Kot von Schlachtarbeitern ohne Symptomatik und bei Rindern gefunden (Inglis et al. 2005; Anonymus, 2002).

C. mucosalis wurde von Schweinen isoliert (Anonymus, 2002).

C. rectus ist assoziiert mit peridontalen Erkrankungen (Anonymus, 2002; Macuch and Tanner, 2000).

C. showae ist in der Mundhöhle und in infizierten Nasenkanälen vorzufinden (Anonymus, 2002; Macuch and Tanner, 2000).

Die Spezies *C. sputorum* beinhaltet drei Biovare. *C. sputorum* bv. *sputorum* kommt in humanen Mundhöhlen vor und wurde bei Durchfällen, Abszessen und Hautläsionen isoliert. Einzelne Stämme wurden auch aus dem Genitaltrakt von Bullen, aus Aborten von Schafen sowie aus Schaf- und Schweinekot isoliert. *C. sputorum* bv. *fecalis* wurde in Schaf- und Rinderkot gefunden. *C. sputorum* bv. *paraureolyticus* wurde aus Rinderkot isoliert und trat bei humanen Durchfallerkrankungen auf (Anonymus, 2002).

C. upsaliensis kommt bei Hunden und Katzen vor und kann dort zu Gastroenteritiden führen (Bender et al. 2005, Wieland et al. 2005). Beim Menschen verursacht er Durchfall, Septikämie, spontane Aborte und das hämolytisch- urämische Syndrom (Anonymus, 2002).

2.6.2 Campylobacteriose beim Menschen

2.6.2.1 Infektionswege

Als Erregerreservoir gelten warmblütige Wild- und Haustiere. Durch den direkten Kontakt zu diesen Tieren (Green et al., 2006; Carrique-Mas et al., 2005; Ethelberg et al., 2005; Jain et al., 2005) oder indirekt über Tierprodukte und kontaminiertes Trink- und Oberflächenwasser (Carrique-Mas et al., 2005; Ethelberg et al., 2005; Kuusi et al., 2005) kann eine Übertragung des Bakteriums auf den Menschen erfolgen. Die Campylobacteriose scheint hauptsächlich lebensmittelbedingt zu sein, wobei Geflügelfleisch und Geflügelfleischprodukte an erster Stelle stehen (Adak et al., 2005). Die Abbildung 4 zeigt das Vorkommen von *Campylobacter* spp. in deutschen Lebensmittelplanproben. Gefahren für den Verbraucher ergeben sich bei ungenügender Hygiene und einer unzureichenden Erhitzung des Produktes. So sind Kreuzkontaminationen mit *Campylobacter* spp. von rohem Geflügelfleisch über Schneidbretter, Teller und Hände mit anderen Lebensmitteln möglich (Luber et al., 2006; Jain et al., 2005; de Boer and Hahne, 1999). Bei vollständiger Durckerhitzung der Lebensmittel wird *C. jejuni* abgetötet (Bostan, 2001). Auf kontaminierten Produkten, die frisch ohne Erhitzung konsumiert werden, wie z.B. Gurken oder Erdbeeren, überlebt *C. jejuni* jedoch lange genug, um ein Risiko für den Verbraucher darzustellen (Kärenlampi and Hänninen, 2004).

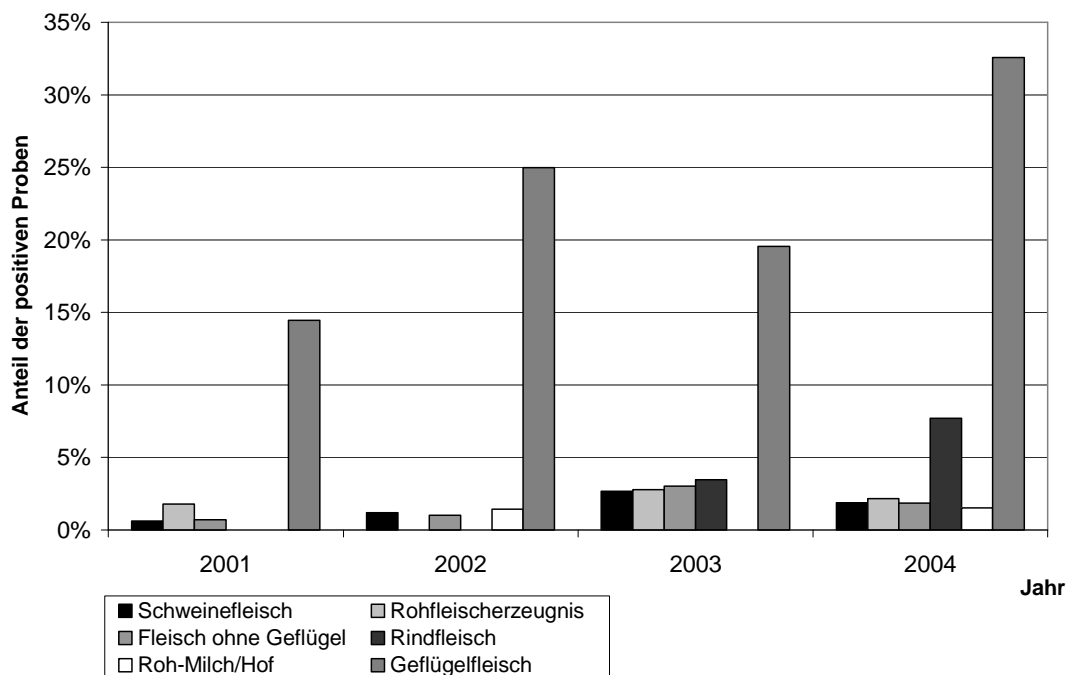


Abb. 4: *Campylobacter* spp. in deutschen Lebensmittelplanproben bei der Lebensmittelüberwachung (Hartung, 2005)

Bei frischem Geflügelfleisch auf Handelsebene variierten die Prävalenzen in Europa 2004 von 5,1% (Norwegen) über 34,5% (Deutschland) bis zu 62,2% (Großbritannien). Proben von frischen Geflügelfleischprodukten zeigten auf Handelsebene Werte von 10,9% (Deutschland) bis 60,4% (Belgien). In Großbritannien waren 42,4% (14/33) frische Wildvogelfleischproben *Campylobacter*- positiv. Schweinefleisch zeigte 2004 im Vergleich zu Geflügelfleisch niedrigere Prävalenzen (1,1%, Norwegen; 2%, Deutschland; 5%, Belgien) und nur einzelne Schweinefleischprodukte waren *Campylobacter*- belastet. In Proben von frischen Rindfleisch und Rindfleischprodukten waren die Prävalenzen noch niedriger. Bei anderen Lebensmitteln wie Weichkäse und halbfestem Käse aus roher oder erhitzter Milch, Muscheln, Früchten und Gemüse waren nur einzelne und bei den untersuchten Fischprodukten keine Probe *Campylobacter*- positiv (EFSA, 2006). Wilson and Moore (1996) konnten in 42% von 380 Schalentierproben thermophile *Campylobacter* spp. isolieren.

Das Vorkommen von gleichen Genotypen bei Geflügel- Isolaten und bei humanen Isolaten spricht dafür, dass Geflügelfleisch als Infektionsquelle für Campylobacteriosen des Menschen fungiert (Cardinale et al., 2006; Siemer et al., 2005; Colles et al., 2003; Manning et al., 2003; Duim et al., 1999). Andererseits zeigten sero- und genotypische Vergleiche, dass es neben Geflügel andere Infektionsquellen wie Rind- und Schweinefleisch oder Heimtiere geben muss (Ishihara et al., 2006; Wieland et al., 2006; Boonmar et al., 2005; Champion et al., 2005; Nielsen et al., 2005; Rozynek et al., 2005; Siemer et al., 2004; Hein et al., 2003; Schouls et al., 2003; Nielsen et al., 1997). Auch der Vergleich der Saisonalität der humanen *Campylobacter*- Infektionen und der *Campylobacter*- Isolate von frischen Hühnerfleischproben im Handel zeigte, dass der Anstieg der humanen Fälle dem Anstieg der Hühner- Isolate vorausging. Dies deutet auf andere Infektionsquellen (Meldrum et al., 2005; Michaud et al., 2004).

Geflügelschlachtpersonal ist aufgrund der starken mit *Campylobacter* spp. belasteten Aerosolentwicklung dreimal mehr gefährdet, an Campylobacteriose zu erkranken als die normale Bevölkerung (Wilson, 2004). Berndtson et al. (1996) verzeichneten eine Campylobacteriose bei neu eingestelltem Schlachtpersonal in der ersten Arbeitswoche.

2.6.2.2 Infektionsdosis

Die minimale Infektionsdosis kann bei *Campylobacter* spp. gering sein. So war eine Infektionsdosis von 500 Bakterien in Milch bei einer Versuchsperson schon krankheitsauslösend (Robinson, 1981). Bei weiteren Infektionsversuchen mit 8×10^2 bis 2×10^9 *C. jejuni*- Keimen wurden 18% bis 46% der Teilnehmer krank ohne eine Dosis-Wirkungs- Beziehung (Black et al., 1988). Dies zeigt, dass die Infektionsdosis sowohl

vom jeweiligen *Campylobacter*- Stamm als auch von der Konstitution des sich Infizierenden abhängig ist. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel zwei bis fünf Tage, kann vereinzelt aber auch bis zu zehn Tage dauern (RKI, 2005).

2.6.2.3 Klinik

Die meisten Infektionen mit *Campylobacter* spp. sind selbstlimitierend und asymptomatisch. Ansonsten entsteht das Bild einer akuten Enteritis mit breiigen bis wässrigen Durchfällen (z.T. blutig), Fieber, Bauchschmerzen und Müdigkeit. Die Erkrankungsdauer beträgt in der Regel bis zu einer Woche (RKI, 2005). In seltenen Fällen können Meningitiden, Septikämien und Peri-, Endo- sowie Myokarditiden auftreten (Uzoigwe, 2005). Als Spätkomplikationen sind reaktive Arthritiden (Leirisalo-Repo, 2005) und das Guillain- Barré- Syndrom, eine autoimmune entzündliche Erkrankung der peripheren Nerven, bei denen die Myelinscheiden zerstört werden, zu nennen (Jeremy et al., 1995).

2.6.2.4 Therapie

In den meisten Fällen ist eine symptomatische Behandlung mit Flüssigkeits- und Elektrolytersatz ausreichend. Bei schweren Verläufen ist eine antibiotische Therapie indiziert, wobei Erythromycin und Quinolone Mittel der Wahl sind (RKI, 2005).

2.6.2.5 Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen

Als wichtigste Bekämpfungsmaßnahme dient die Aufklärung der Verbraucher. Bei der Zubereitung von Speisen muss auf konsequente Küchenhygiene geachtet werden. Jede Kreuzkontamination zwischen rohem Geflügelfleisch bzw. Auftauwasser und anschließend nicht mehr erhitzten Speisen ist zu vermeiden. Fleisch, insbesondere Geflügelfleisch, sollte nur durchgegart verzehrt werden. Es ist ebenso angebracht, „Rohmilch ab Hof“ vor Genuss abzukochen, oder pasteurisierte Milch zu verwenden. Außerdem sollte kein unbehandeltes Oberflächenwasser getrunken werden (RKI, 2005).

2.6.2.6 Gesundheitliche und ökonomische Bedeutung

In Deutschland waren *Campylobacter* spp. 2005 (61.823 gemeldete Fälle) vor den Salmonellen (51.979 gemeldete Fälle) die häufigsten meldepflichtigen bakteriellen Enteritiserreger (RKI, 2006). Abbildung 5 gibt eine Übersicht über gemeldete bakterielle Darmerkrankungen in Deutschland. In den warmen Monaten kommt es zu einer Häufung der *Campylobacter*iosefälle, wobei vor allem Kleinkinder unter sechs Jahren und Erwachsene zwischen 20 und 29 Jahren, und hierbei insbesondere Männer, betroffen sind (RKI, 2005). Die Erkrankungen beim Menschen sind in

Deutschland hauptsächlich durch *C. jejuni* (2004: 90,8% der gemeldeten und differenzierten Fälle) und daneben durch *C. coli* verursacht. Auch in anderen Ländern Europas zeigt sich ein ähnliches Bild. Vereinzelt werden auch *C. lari*, *C. upsaliensis* und *C. fetus* als Durchfallerreger isoliert (EFSA, 2006).

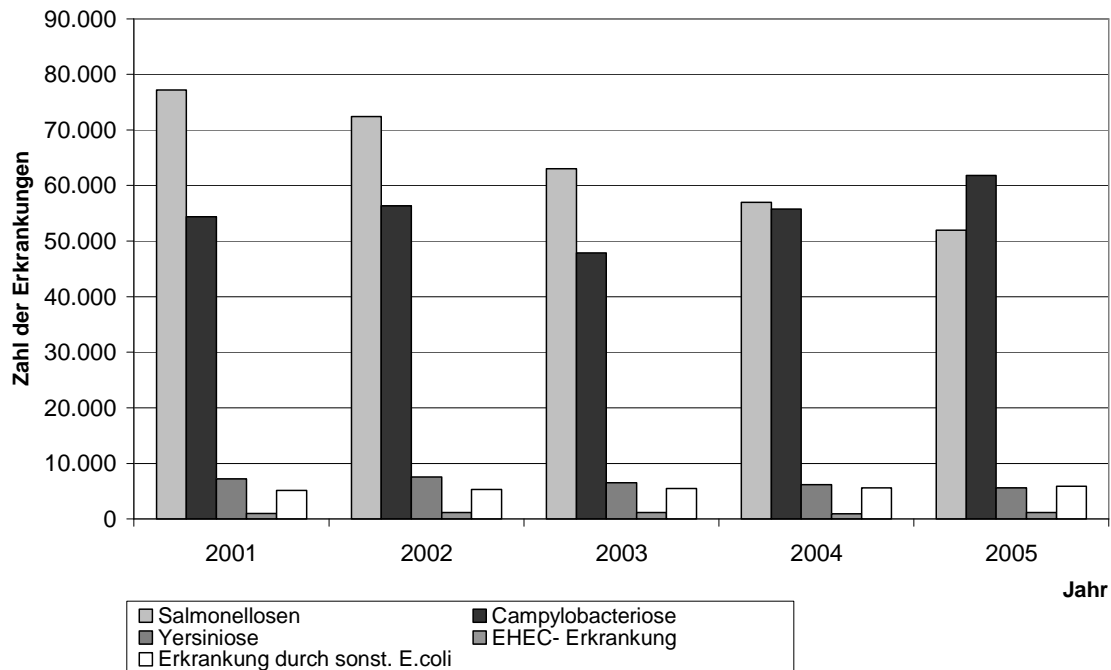


Abb. 5: Gemeldete bakterielle Darmerkrankungen in Deutschland (RKI, 2006; Hartung, 2005)

2.6.3 *Campylobacter* spp. beim Mastgeflügel

2.6.3.1 Geflügelmast

2.6.3.1.1 Herdenprävalenz

Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. in Geflügelherden variiert in Abhängigkeit von der Region, der Jahreszeit, der Haltungform, dem Schlachtalter, der Probennahme und der Untersuchungsmethode. So nahm sie bei Masthähnchenherden in europäischen Ländern 2004 Werte von 3% (Norwegen) über 27% (Dänemark) bis 91% (Italien) an (Tab. 6). Dabei war *C. jejuni* mit 60-95% die dominierende Spezies. Nur Italien und Frankreich berichteten von einer Gleichverteilung von *C. jejuni* und *C. coli* (EFSA, 2006). Bei Geflügel in Nigeria und Thailand war *C. coli* die vorherrschende Spezies (Aboaba and Smith, 2005; Padungtod and Kaneene, 2005).

Land	Jahr			
	2001	2002	2003	2004
Dänemark	42%	43%	35%	27%
Finnland	4%	-	6%	6%
Italien	-	87%	71%	91%
Niederlande	16%	27%	-	10%
Norwegen	8%	6%	5%	3%
Österreich	-	58%	59%	65%
Schweden	16%	20%	18%	14%

Tab. 6: *Campylobacter*- Prävalenzen in Masthähnchenherden (EFSA, 2006)

In verschiedenen Studien wurde eine jahreszeitliche Schwankung im Vorkommen von *Campylobacter* spp. beim Geflügel beobachtet, wobei vor allem in den warmen Monaten mit einem verstärkten Auftreten zu rechnen ist. So stiegen die Prävalenzen von Juni bis September an und zeigten häufig eine zweite Spitze im November (Barrios et al., 2006; Bouwknecht et al., 2003; Refrégier- Petton et al., 2001; Wedderkopp et al., 2000; Wallace et al., 1997; Berndtson et al., 1996b; Jacobs- Reitsma, 1994). Patrick et al. (2004) beschrieben eine steigende Inzidenz bei durchschnittlichen Lufttemperaturen ab 8°C und eine stark steigende Inzidenz bei Temperaturen zwischen 13 und 20°C sowie einen schwächeren Anstieg bei höheren Temperaturen. Die Nutzung von Durchschnitts- und Maximaltemperaturen drei Wochen vor dem Schlachtermin ergaben die beste Prävalenzschätzung, gefolgt von einem Modell, das Durchschnittstemperatur und Sonnenscheindauer einschloss. Auch Wallace et al. (1997) berichteten von einer Korrelation der *Campylobacter*- Prävalenz mit der Sonnenscheindauer und den minimalen sowie maximalen Temperaturen. In einzelnen Untersuchungen wurde jedoch ein Fehlen der jahreszeitlich bedingten Schwankung in der *Campylobacter*- Prävalenz beobachtet (Evans and Sayers, 2000; Humphrey et al., 1993).

Während Heuer et al. (2001) und Fernández et al. (1993) einen signifikanten Unterschied in der *Campylobacter*- Prävalenz in Abhängigkeit von der Haltungsform mit höheren Prävalenzen in Herden mit Freilauf sahen, konnten Wittwer et al. (2005) dies nicht feststellen.

Ein weiterer Zusammenhang scheint zwischen dem Schlachalter und der *Campylobacter*- Belastung zu bestehen. So wurde von einer höheren Prävalenz mit steigendem Tieralter berichtet (Barrios et al., 2006; Bouwknecht et al., 2003; Evans and Sayers, 2000; Berndtson et al., 1996b). Jacobs- Reitsma et al. (1994) dagegen sahen keinen Zusammenhang zwischen Schlachalter und *Campylobacter*- Status.

2.6.3.1.2 Innerherdenprävalenz

Bei frühem Eintrag in die Herde und einer schnellen Infektion aller Tiere innerhalb von wenigen Tagen sollten zum Zeitpunkt der Schlachtung alle Tiere mit *Campylobacter* spp. infiziert sein (Van Gerwe et al., 2005; Gregory et al., 1997; Jacobs- Reitsma et al., 1995). Die Ausbreitung geschieht durch die direkte Übertragung von Tier zu Tier, aber auch indirekt durch Koprophagie und Aufnahme von kontaminiertem Futter bzw. Tränkwasser. Payne et al. (1999) berichteten von relativ hohen (60%) und niedrigen (28%) Prävalenzen bei zwei Masthähnchenherden trotz gleichem Erstinfektionszeitpunkt. Dies könnte durch ein unterschiedliches Kolonisationsverhalten der beteiligten *C. jejuni*- Stämme erklärt werden. Auch Sandberg et al. (2005) und Hein et al. (2003) konnten verschieden hohe Innerherdenprävalenzen nachweisen. Niedrige Innerherdenprävalenzen deuten demnach auf einen späten Eintrag von *Campylobacter* spp. kurz vor dem Schlachttermin oder auf ein geringes Kolonisationsvermögen des Stammes.

2.6.3.1.3 Kolonisation

In einer Studie zur Entwicklung der Mikroflora im Hühnerdarm wurden bei jungen Tieren im Dünndarm und Blinddarm vor allem Laktobazillen vorgefunden, wobei Bifidobakterien bei älteren Tieren im Blinddarm häufiger vorkamen. Im Dünndarm einiger Jungtiere wurden Clostridien detektiert. Bei alten Tieren waren Salmonellen, *Campylobacter* spp. und *E. coli* vorzufinden (Amit- Romach et al., 2004). In der Regel fand die Kolonisation mit *Campylobacter* spp. ab der zweiten Woche statt (Gregory et al., 1997; Berndtson et al., 1996a; Jacobs- Reitsma et al., 1995). Dabei war eine minimale Infektionsdosis von 40-1000 KbE ausreichend (Cawthraw et al., 1996; Bolder and Mulder, 1991). Die Kolonisationsfähigkeit war sowohl stamm- als auch wirtsabhängig. So zeigte sich ein unterschiedliches Kolonisationsverhalten bei verschiedenen *C. jejuni*- Stämmen und verschiedenen Zuchtlinien (Boyd et al., 2005; Stas, 1999). Eine erfolgte Passage in Masthähnchen erhöhte das Kolonisationspotential verschiedener Stämme (Ringoir and Korolik, 2003; Cawthraw et al., 1996). Einmal in die Herde eingebracht, kam es zur schnellen Infektion aller Tiere ohne Auslösung von Krankheitssymptomen (Van Gerwe et al., 2005; Evans and Sayers, 2000; Berry et al., 1988). Der Blinddarm war neben Dickdarm und Kloake der Hauptkolonisationsort und beherbergte 10^5 - 10^9 KbE/g Kot (Rosenquist et al., 2006; El-Shibiny et al., 2005; Achen, 1998; Wallace et al., 1997; Aho and Hirn, 1988; Altmeyer et al., 1985). *C. jejuni* lag dabei als dicht gepackte Zellen im Darmlumen vor (Berry et al., 1988). Im Dünndarm bzw. Kropf fanden sich Keimzahlen von 10^4 - 10^6 bzw. 10^3 KbE/g (Achen, 1998; Wallace, 1997). In anderen Organen fand ebenfalls eine schnelle

Besiedlung statt (Cox et al., 2005). Laut Berry et al. (1988) waren *Campylobacter* spp. dabei nicht histologisch in Herz, Milz, Leber, Gallenblase, Nieren, Magen und Dünndarm aufzufinden. Die Abbildung 6 zeigt *C. jejuni* im Darmlumen von Masthähnchen.

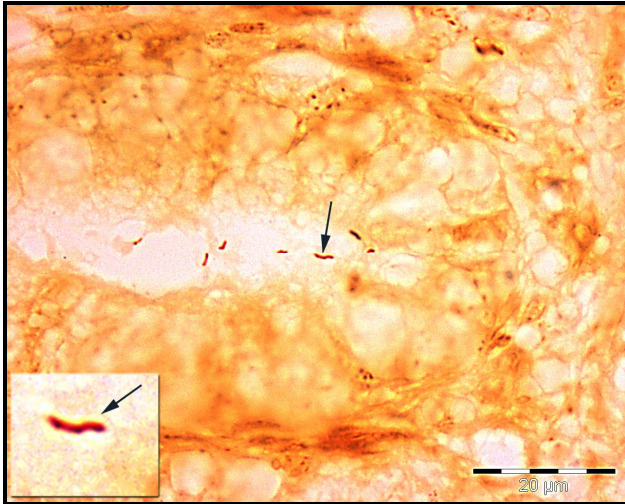


Abb. 6: *C. jejuni* im Darmlumen von Masthähnchen (Warthem- Starry- Färbung; Quelle: Dr. Reetz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin)

2.6.3.1.4 Risiken für den Eintrag in die Herde

Durch fehlende oder mangelnde Hygienemaßnahmen wird der Eintrag von *Campylobacter* spp. in die Geflügelmast ermöglicht. So können ein Fehlen von Hygienebarrieren wie ein regelmäßiger Schuh- und Kleidungswechsel, die Reinigung und Desinfektion der Hände, das Benutzen von stalleigenen Geräten und die Benutzung von Desinfektionsmatten im Stalleingangsbereich eine Keimverschleppung in die Herden begünstigen (Cardinale et al., 2004; Evans and Sayers, 2000; Gregory et al., 1997; Humphrey et al., 1993). Eine unzureichende Reinigung und Desinfektion des Stalles bedingt durch schlechte Bausubstanz (Risse, Spalten), den Einsatz nicht geeigneter Desinfektionsmittel, zu geringer Desinfektionsmittelkonzentrationen sowie Nichteinhaltung der optimalen Wirktemperatur und Wirkdauer können zur Erregerpersistenz führen. Eintragsquellen in die Geflügelmast sind infizierte Wildvögel (Hubalek, 2004; Gregory et al., 1997), Schädlinge wie Mäuse, Ratten (Meerburg et al., 2006; Berndtson et al., 1996b; Pearson et al., 1993) und Getreidekäfer (Strother et al., 2005; Bates et al., 2004; Skow et al., 2004; Refrégier- Petton et al., 2001) sowie Fliegen (Ekdahl et al., 2005; Nichols, 2005; Hald et al., 2004). In der Nähe gehaltene Haustiere (Geflügel, Rinder, Schweine, Hunde, Katzen) können zudem als Erregerreservoir gelten (Cardinale et al., 2004; Bouwknecht et al., 2003; Gregory et al.,

1997; van de Giessen, 1996). In einigen Fällen wird auch die fraktionierte Schlachtung als Infektionsgefahr betrachtet. Sowohl die Fänger als auch unzureichend gereinigte und desinfizierte Transportboxen werden als Vektoren angesehen (Hansson et al., 2005; Ramabu et al., 2004; Newell et al., 2001). Barrios et al. (2006) und Russa et al. (2005) sahen jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der fraktionierten Schlachtung und einem steigenden Risiko der *Campylobacter*- Infektion der verbleibenden Tiere. Als letztes sei noch das kontaminierte Tränkwasser genannt (Bull et al., 2006; Pearson et al., 1993). Amöben, Algen und andere Einzeller ermöglichen *Campylobacter* spp. ein Überleben in diesem Medium (Axelsson et al., 2005; Snelling et al., 2005). Frische trockene Einstreu und Futter scheinen keine Infektionsquelle darzustellen, was durch einen äußerst geringen Wassergehalt nachvollziehbar ist (Jacobs- Reitsma et al., 1995; Humphrey et al., 1993; Pearson et al., 1993).

2.6.3.1.5 Vertikale Übertragung

Auch wenn einige Autoren (Cox et al., 2002; Jacobs- Reitsma, 1994) eine *Campylobacter*- Übertragung von den Elterntieren auf die Hühnerküken aufgrund positiver Befunde auf beiden Seiten nicht ausschließen, wurden in vielen Studien bei neu eingestellten Hühnerküken keine *Campylobacter* spp. isoliert. Dies macht eine vertikale Übertragung von den Elterntieren unwahrscheinlich (Payne et al., 1999; Gregory et al., 1997; Berndtson et al., 1996a; Jacobs- Reitsma et al., 1995; Humphrey et al., 1993; Altmeyer et al., 1985). Pearson et al. (1993) konnten zusätzlich auf Zuchteiern keine *Campylobacter* spp. finden.

2.6.3.1.6 Kontamination während des Transportes

Unzureichend gereinigte und mangelhaft desinfizierte Transportboxen stellen ein Kontaminationsrisiko für die Herde dar. *Campylobacter*- negative Herden auf Farmlevel waren im Schlachthof häufig *Campylobacter*- positiv nach Transport in belasteten Transportkisten (Hansson et al., 2005; Newell et al., 2001). Zusätzlich erhöhte der Transportstress die Ausscheidung von *Campylobacter* spp. mit dem Kot (Whyte et al., 2001).

2.6.3.1.7 Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen

In verschiedenen Ländern wie Deutschland, Norwegen, Dänemark, den Niederlanden und Schweden laufen Monitoring- Programme zur Erfassung des Ausmaßes der *Campylobacter*- Belastung in Geflügelbeständen. Norwegen führte 2001 einen offiziellen Aktionsplan ein, und Finnland setzte 2004 sein Kontrollprogramm in Kraft. Beide Programme konzentrieren sich auf einen hohen Grad an Biosicherheit auf

Farnebene, um eine Infektion der Herde mit *Campylobacter* spp. zu verhindern. Gleichzeitig vollziehen sie eine logistische Schlachtung (Schlachtung von *Campylobacter*-belasteten Herden am Ende des Tages), um eine Kreuzkontamination auszuschließen. Weiterhin werden die Karkassen von *Campylobacter*-positiven Herden tiefgefroren oder einer Hitzebehandlung unterworfen (EFSA, 2006). Seit 1998 werden in Dänemark die Mäster für *Campylobacter*-freie Masthähnchen mit einem besseren Verkaufspreis belohnt (Wedderkopp et al., 2000). Auch Island betreibt eine ähnliche Politik. Die Masthähnchenherden werden vor der Schlachtung auf *Campylobacter* spp. untersucht, und Fleisch von positiven Tieren wird tiefgefroren. Dies hat einen Preisverlust für die Produzenten zur Folge und fördert die Bemühungen, *Campylobacter* spp. in den Herden zu eliminieren (Barrios et al., 2006). Dänemark, Norwegen und Schweden haben in den letzten drei Jahren einen Rückgang der *Campylobacter*-Prävalenzen, vielleicht als Folge der Einführung von Kontrollmaßnahmen, zu verzeichnen (EFSA, 2006).

In verschiedenen Studien wurden Versuche der *Campylobacter*-Reduktion und -Elimination durch Verdrängungskolonisation mit apathogenen *Campylobacter*-Stämmen (Chen and Stern, 2001; Weber, 2000), Impfung mit avirulenten *Salmonella*-Stämmen, die ein *Campylobacter*-Antigen tragen (Sizemore et al., 2005; Wyszzyńska et al., 2004), den Einsatz von Bakteriophagen (Atterbury et al., 2005; Wagenaar et al., 2005; Connerton et al., 2004) und Bakteriozinen (Stern et al., 2005; Svetoch et al., 2005) sowie durch Zufütterung von Futtersäuren (Heres et al., 2004) und Pro- oder Prebiotika (Ding et al., 2005; Rastall, 2004) unternommen. Diese Maßnahmen zeigten jedoch nur teilweise Erfolg, indem sie die quantitative Belastung mit *Campylobacter* spp. z.T. reduzierten. Eine vollständige Elimination von *Campylobacter* spp. konnten sie allerdings nicht bewirken.

Berrang and Northcutt (2005) beschrieben eine einfache Methode, um *Campylobacter* spp. auf Transportkisten zu eliminieren. Ein Absprühen der Kisten mit Wasser und einer anschließenden Trocknungszeit von 24 Stunden oder eine alleinige Trocknungszeit von 48 Stunden erbrachten die Abtötung von $7,3 \log_{10}$ KbE/5cm² und führten ebenfalls zur starken Reduktion von Coliformen und *E. coli*.

2.6.3.2 Prozess der Schlachtung und Fleischgewinnungstechnologie

2.6.3.2.1 Keimkonzentration und Kreuzkontamination

Im Rahmen des Schlachtprozesses kann es an verschiedenen Stellen der Produktion zum Keimeintrag, zur Kreuzkontamination aber auch zur Keimreduktion kommen (Rasschaert et al., 2006; Nauta et al., 2005; Sandberg et al., 2005; Newell et al., 2001;

Berndtson et al., 1992). Beim Brühen können durch kontaminiertes Brühwasser *Campylobacter* spp. auf den Tierkörper übergehen. Zwar wird ein Großteil der *Campylobacter*- Keime durch die Brühtemperaturen von 50-60°C abgetötet, doch ein Teil überlebt und führt zur Kreuzkontamination. Gleichzeitig kommt es zur Entstehung von Aerosolen, die als Vehikel dienen (Pearson et al., 1993). Beim Rupfvorgang bleiben *Campylobacter* spp., die von der Haut, der Kloake (Berrang et al., 2001), den Federn und den Federfollikeln von positiven Tieren stammen, an den Rupffingern hängen und werden somit auf folgende Tierkörper übertragen. Eine weitere Schwachstelle ist die Evisceration, vor allem, wenn dabei das Darmkonvolut beschädigt wird. Mit dem Darminhalt aber auch dem Kropfinhalt gelangen *Campylobacter* spp. auf die Karkasse. Laut Byrd et al. (1998) ist der Kropfinhalt bei einigen Herden signifikant häufiger mit *Campylobacter* spp. belastet als der Blinddarminhalt, hervorgerufen durch einen verlängerten Futterentzug und damit der Aufnahme von kontaminierter Einstreu. Durch nicht ausreichende Desinfektion sämtlicher mit den Tierkörpern in Kontakt kommenden Schneide- und Transportvorrichtungen kann es ebenfalls zur Kreuzkontamination kommen (Cools et al., 2005; Berrang and Dickens, 2000; Izat et al., 1988). Die sich anschließenden Wasch- und Kühlvorgänge hingegen führen zur Reduktion der *Campylobacter*-Konzentration (Rosenquist et al., 2006). Ein eventuell stattfindendes Gefrieren resultiert wiederum in einer Keimzahlreduktion (Rosenquist et al., 2006; Bhaduri und Cottrell, 2004; Aho and Hirn, 1988; Altmeyer et al., 1985).

Bei genotypischer Untersuchung von *Campylobacter* spp. im Schlachtverlauf wird von einem breiten Spektrum an Genotypen am Anfang und von einer Konzentration einzelner Stämme am Ende des Schlachtprozesses berichtet (Alter und Fehlhaber, 2003; Newell et al., 2001). Die Hühnerkarkasse (ohne Innereien) ist dabei mit bis zu 6 log₁₀ KbE belastet (Nannapaneni et al., 2005; Jørgensen et al., 2002).

2.6.3.2.2 Kontroll- und Bekämpfungsmaßnahmen

Zu einer Verminderung der Kreuzkontamination führen die strikte Einhaltung der Guten- Hygiene- Praktiken mit Maßnahmen zur Keimreduktion an den kritischen Punkten, zu denen z.B. der Zeitraum zur Nüchterung vor der Schlachtung, der Transport des lebenden Geflügels in unzureichend gereinigten Transportkisten, die Wasserbad- Betäubung, der Brühprozess durch kontaminiertes Brühwasser, das Rupfen durch kontaminierte Rupffinger, die Evisceration durch eine Kontamination der automatischen Eviscerationsmaschinen, die nachfolgenden Schlachtmaschinen und Instrumente durch Kontamination und die Kühlung zählen. Rosenquist et al. (2006) beschrieben eine Korrelation zwischen *Campylobacter*- Konzentration im Darminhalt

und auf den Tierkörpern nach Entfederung und messen der Keimzahlreduktion in der Mast einen bedeutenden Einfluss auf die Keimzahlkonzentration auf dem Endprodukt bei.

Viele Studien beschäftigten sich mit der Dekontamination von Schlachtwasser und Tierprodukten durch chemische oder physikalische Maßnahmen.

Der Zusatz von Essigsäure zum Brühwasser mit einem pH- Wert von 4 reduzierte die Keimzahl von *C. jejuni* in 2 min um das Zehnfache, resultierte jedoch in einem streng sauren Geruch (van der Wal and Mulder, 1996). Die Beimischung von 20 mg Chlor auf 1L Tauchkühlwasser ergab eine signifikante Reduktion der Keimzahlen von *Campylobacter* spp. um $0,43\log_{10}$ KbE/100ml im Tierkörperspülwasser (Buhr et al., 2005). Waschsysteme, die gechlortes Wasser (25-35 mg/L) nutzten, konnten die durchschnittlichen *Campylobacter*- Keimzahlen um $0,5\log_{10}$ KbE/ml senken. Die Beigabe von Natriumphosphat oder Natriumchlorit ergab eine Keimzahlreduktion von $1,03-1,26\log_{10}$ KbE/ml (Bashor et al., 2004). Der Einsatz von Kalium- Phosphat- und Fettsäure- Lösungen führte ebenfalls zur signifikanten Reduktion von *Campylobacter* spp. auf Hähnchenhaut (Hinton and Ingram, 2005). Monocaprinlösungen zeigten eine Reduktion von *C. jejuni* um $>6\log_{10}$ innerhalb einer Minute bei Raumtemperatur, und zeigten auch vergleichbare Reduktionserfolge bei *Salmonella* und *E. coli* innerhalb von 10 min in Verbindung mit Citrat- Lactat- Puffer bei ein pH- Wert von 4-5 (Thormar et al., 2006). Der Einsatz von Chlor, Natriumchlorit oder Peressigsäure in Konzentrationen von 100 mg/L für 15 min ergab eine Keimzahlreduktion um $1\log_{10}$ auf der Hähnchenhaut (Chantarapanont et al., 2004). Waschwasser mit 0,5% Milchsäure und 0,05% Natriumbenzoat konnte ebenfalls eine Reduktion von *Campylobacter* spp. bewirken (Hwang and Beuchat, 1995). Eine vollständige Elimination konnte jedoch durch die verschiedenen Maßnahmen nicht erreicht werden. Ein Grund hierfür ist die Schutzwirkung der Haut. Durch den Brühvorgang werden die Follikel geöffnet und ermöglichen den Mikroorganismen sich festzusetzen. Diese verbleiben dort, wenn sich die Follikel durch die Kühlung wieder schließen (Berndtson et al. 1992). Eine Behandlung mit Desinfektionsmitteln im Waschwasser wird diese Keime nicht erreichen.

Tiefgefrieren (-18°C) reduzierte die Keimzahl von *C. jejuni* auf Hähnchen- Tierkörpern um $2\log_{10}$ pro Tierkörper in vier Wochen (Bhaduri und Cottrell, 2004; Aho and Hlrm, 1988; Altmeyer et al., 1985). Die Behandlung von Hähnchenhaut mit lytischen Bakteriophagen zeigte eine signifikante Reduktion von *Campylobacter* spp. (Goode et al., 2003). γ - Strahlung zeigte bei Geflügelfleisch mit einer Bestrahlungsdosis von 1 kGy eine Keimreduktion von $4\log_{10}$ - Einheiten (Patterson, 1995).

2.6.4 *Campylobacter* spp. bei anderen Tieren

Neben Masthähnchen als Hauptreservoir für *Campylobacter* spp. dienen auch andere Tiere als Infektionsquelle. So waren 22% bzw. 94% der in Deutschland bzw. in Italien untersuchten Puten *Campylobacter*- positiv. Bei in Italien untersuchten Wildvögeln waren bis zu 14% mit *Campylobacter* spp. belastet (EFSA, 2006). Möwen in Norddeutschland waren zu 62% mit *Campylobacter* spp. infiziert, wobei die jungen Tiere hauptsächlich *C. jejuni* und die älteren Tiere *C. coli* beherbergten (Glünder et al., 1991). In Taiwan waren 44% der Enten mit *Campylobacter* spp. belastet, ein Großteil der Isolate wurde durch *C. jejuni* repräsentiert (Tsai and Hsiang, 2005). Auch Tauben und Stockenten beherbergten *Campylobacter* spp. (Lillehaug et al., 2005). Emus, Falken, Strauße und Papageien wurden ebenfalls als symptomlose Träger von *Campylobacter* spp. identifiziert (Oyarzabal et al., 1995).

Die in Europa gemeldeten Prävalenzen in Schweineherden rangierten 2004 von 25% (Deutschland) bis 80% (Dänemark) und in Rinderherden von 14% (Deutschland) bis 64% (Dänemark). Während bei Rinderherden *C. jejuni* mit 50-100% die vorherrschende Spezies war, übernahm diese Stellung *C. coli* in Schweineherden. In Italien waren 22% der Schafherden und 0,5% der Wasserbüffel *Campylobacter*- positiv (EFSA, 2006).

Auch Hunde und Katzen beherbergen *Campylobacter* spp. 2004 lagen die Prävalenzen bei 2% (Niederlande, Deutschland) und 5% (Italien) für Katzen und bis zu 37% (Niederlande) für Hunde (EFSA, 2006). In der Schweiz wurden Prävalenzen von 42% bei Katzen und Hunden ermittelt. Bei jungen Hunden und Katzen wurden vor allem *C. upsaliensis* und *C. helveticus* isoliert. Neben diesen beiden Spezies kam auch *C. jejuni* vor (Wieland et al., 2005). In den USA trugen 24% der untersuchten Katzen *Campylobacter* spp. mit einem Hauptanteil an *C. upsaliensis* (Bender et al., 2005).

2.7 Probennahme

Zur Bestimmung der Herdenprävalenz wurden meist 5-10 Kloakentupfer oder Blinddarmkotproben gezogen und einzeln oder als Poolprobe untersucht (Wittwer et al., 2005; Hein et al., 2003; Wedderkopp et al., 2000; Aho and Hirn, 1988; Prescott and Gellner, 1984). Da es auf dem Weg zum Schlachthof und im Schlachtprozess zur Kreuzkontamination kommen kann, ist die sterile Entnahme von Blinddarmkotproben die bessere Variante, da sie die Möglichkeit einer Kreuzkontamination ausschließt (Sandberg et al., 2005). Hinzu kommt, dass der Blinddarm der Hauptkolonisationsort von *Campylobacter* spp. ist. Sieben Blinddarmpaare sind dabei ausreichend, um 90% (90%-100%) der positiven Herden zu identifizieren (Sandberg et al., 2005).