

3 Eigene Untersuchungen

Die *Campylobacter*-Stämme wurden in Anlehnung an die ISO 10272: 1995/Cor.1:1996(E): *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Campylobacter growing at 41.5°C* isoliert und nach Spezies differenziert. Die anschließende Feintypisierung ausgewählter *Campylobacter*-Isolate mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde nach der von CAMPYNET (<http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html>) empfohlenen Methode durchgeführt.

Eine computergestützte Auswertung der PFGE-Ergebnisse erfolgte mit der Software GelCompar II™ Version 3.0 (Applied Maths BVBA, Belgien).

3.1 Material

3.1.1 Nährmedien

3.1.1.1 Nährmedien für den Transport von *Campylobacter* spp.

Cary Blair-Nährboden

Tupferproben von Kot, Stallboden, Transportkisten und Schlachtkörperoberflächen wurden für die weitere Isolierung und Differenzierung des Keimes gekühlt im Transportmedium zum Labor befördert. Als Nährmedium wurde dafür halbfestes, modifiziertes Cary Blair-Medium verwendet:

Cary Blair-Nährboden (g/l Aqua bidest.)

Produkt:	<u>Cary Blair-Nährboden, halbfest (Oxoid, Art.-Nr. CM 519B)</u>	13,3 g/l
	di-Natriumhydrogenphosphat	1,1 g/l
	Natriumthioglycolat	1,5 g/l
	NaCl	5,0 g/l
	Calciumchlorid	0,09 g/l
	Agar	5,6 g/l
Zusatz:	1% Na-Pyruvat	10,0 g/l
pH-Wert:	8,4/25°C, Toleranz: 0,2	
Wasser:	Aqua bidest.	

Sterilisation: Dampfkochapparat, 100°C, 15 Minuten

Zubereitung

Das abgewogene Pulver wurde in der vorgesehenen Wassermenge suspendiert und der Ansatz bis zur vollständigen Lösung des Agars im Dampfkochapparat aufgekocht. Dem Ansatz wurde Na-Pyruvat dazu gegeben und alles aufgerührt. Währenddessen wurde der pH-Wert gemessen und ggf. korrigiert. Nach Sterilisieren des Nährmediums wurde es in Portionen von à 8 ml in Endgefäße (Reagenzröhrchen mit Metallkappen) in Hochschicht abgefüllt. Eine Übersicht über Kontrolle, Lagerung und Haltbarkeit des Nährmediums gibt die Tab. 10.

3.1.1.2 Nährmedien zur Isolierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.

Preston Selektiv-Anreicherungsbouillon

Für die Vermehrung der Keime wurden die Proben in eine selektive Anreicherung überführt. Als Anreicherungsmedium wurde Preston Selektiv-Anreicherungsbouillon eingesetzt, welche dem Wachstum von *Campylobacter* spp. bei gleichzeitiger Hemmung der Begleitkeimflora im Untersuchungsmaterial diene.

Preston Selektiv-Anreicherungsbouillon (g/l Aqua bidest.)

Basismedium

Produkt:	<u>Nährbouillon Nr. 2 (Fertigbouillon, Oxoid, Art.-Nr. CM 67)</u>	25,0 g/l
	Fleischextract „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:	7,5/25°C, Toleranz: 0,2	
Wasser:	Aqua bidest.	
Sterilisation:	Autoklav, 121°C, 15 Minuten	

Supplement (Anreicherung)

Produkt:	<u><i>Campylobacter</i>-Anreicherungs-Supplement(Oxoid,Art.-Nr.SR 84E)</u>	
Zusammensetzung/Röhrchen (R):		2 R/l
	Natriumpyruvat	0,125 g

Natriumdisulfit	0,125 g
Eisenbisulfat	0,125 g

Supplement (Hemmstoff)

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

Zusammensetzung/Röhrchen (R):	2 R/l
Polymyxin B	2500 IE
Rifampicin	5 mg
Trimethoprim	5 mg
Amphotericin B	5 mg

Zubereitung

a) Basis

Unter Rühren wurde das abgewogene Pulver im vorgesehenen Wasservolumen vollständig suspendiert und anschließend bei 121°C für 15 Minuten im Autoklav sterilisiert. Nach kurzem Aufrühren wurde die Basis auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert gemessen, bzw. bei Bedarf korrigiert.

b) Supplemente und Zusatz

Der Inhalt des jeweiligen Röhrchens wurde aseptisch in 2 ml sterilem Aqua dest. gelöst. Die erforderliche Menge Pferdeblut (50 ml/l) wurde aseptisch abgemessen.

c) Komplett-Medium

Für die Anfertigung von 1l Preston Selektiv-Anreicherungsbouillon wurden aseptisch 50 ml lysiertes Pferdeblut, 2 gelöste Röhrchen *Campylobacter*-Selektiv-Supplement und 2 gelöste Röhrchen *Campylobacter*-Anreicherungs-Supplement unter leichtem Rühren der Basis hinzugegeben und gut vermischt. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und ggf. korrigiert. Eine Übersicht über Kontrolle, Lagerung und Haltbarkeit des Nährmediums gibt die Tab. 10.

Karmali Selektivnährboden (KARMALI et al., 1986)

Für eine weitere spezifisch-selektive Isolierung von *Campylobacter* spp. wurden von der bebrüteten Anreicherungsbouillon jeweils 10 µl auf blutfreien Karmali-Agar überführt und anaerob inkubiert. Dieser setzte sich aus einem Basis-

medium für das Wachstum von *Campylobacter* spp. und einem Selektiv-Supplement für die Hemmung der Begleitkeimflora zusammen.

Karmali-Agar (g/l Aqua bidest.)

Basismedium

Produkt:	<u><i>Campylobacter</i>-Agar-Basis nach Karmali, blutfrei</u>	43,0 g/l
	<u>(Oxoid, Art.-Nr. CM 935B)</u>	
	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: Autoklav, 100°C, 15 Minuten

Supplement (Hemmstoff)

Produkt: *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

Zubereitung

a) Basis

Das abgewogene Substrat wurde in der Hälfte der vorgesehenen Wassermenge angeschlämmt und unter Rühren 10 Minuten quellen gelassen, bevor das restliche Wasser zugegeben wurde. Der Ansatz zur Lösung des Agars wurde für wenige Minuten im Dampfkochapparat aufgekocht und danach aufgerührt. Anschließend erfolgte eine pH-Wert-Messung mit Korrektur bei Bedarf. Die Basis wurde dann 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert, kräftig aufgerührt und im Wasserbad auf 45-50°C temperiert.

b) Supplement

Die erforderliche Menge Substrat (2 Röhren/l) wurde aseptisch unter der Werkbank in 2 ml sterilem Aqua dest. und 2 ml Ethanol (1:1) gelöst.

c) Komplett-Medium

Das gelöste Supplement wurde aseptisch zu 1l steriler, auf 50°C temperierter *Campylobacter*-Agar-Basis unter leichtem Rühren zugegeben. Es folgte eine pH-Wert-Kontrolle und ggf. eine Korrektur. Anschließend wurden die Platten mit Namen und Datum (Tecnoprint) gekennzeichnet und dann gegossen. Eine Übersicht über Kontrolle, Lagerung und Haltbarkeit des Nährmediums gibt die Tab. 10.

Mueller-Hinton-Blutagar

Für eine erste Passage wurde im weiteren Verlauf der Isolierung jeweils eine *Campylobacter*-verdächtige Kolonie auf Mueller-Hinton-Blutagar überimpft und anaerob bebrütet.

Mueller-Hinton-Blutagar (g/l Aqua bidest.)

Produkt:	<u>Mueller-Hinton-Nährboden (Oxoid, Art.-Nr. CM 337)</u>	38,0 g/l
	Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g	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

Zubereitung

Das Nährmedium wurde aus dehydratisiertem Pulver/Granulat und Blut von institutseigenen Schafen (BgVV) oder anderen Quellen (Froschek, Mülheim) zubereitet. Dafür wurden 38,0 g Mueller-Hinton-Agar in 1l Aqua dest. gelöst und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde das Nährmedium auf 50°C abgekühlt und es wurden ihm aseptisch 50 ml Schafblut unter leichtem

Rühren zugegeben. Nach Durchmischung des Nährmediums und Kennzeichnung der Petrischalen mit Namen und Datum (TecnoPrint) wurden die Platten gegossen. Eine Übersicht über Kontrolle, Lagerung und Haltbarkeit des Nährmediums gibt die Tab. 10.

Brucella-Bouillon

Als zweite Passage erfolgte das Überimpfen von *Campylobacter*-Koloniematerial vom bebrüteten Mueller-Hinton-Agar in Brucella-Bouillon. Die Brucella-Bouillon diente der Untersuchung auf Beweglichkeit, sowie nach Bebrütung als Ausgangsmedium für den Test auf Nalidixin-/Cephalothinempfindlichkeit und Wachstum bei 25°C und 43°C.

Brucella-Bouillon (g/l Aqua dest.)

Produkt:	<u>Brucella Bouillon (Difco, Art.-Nr. 0495-17)</u>	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
	Natriumhydrogensulfid	0,1 g/l

pH-Wert: 7,0/25°C, Toleranz: 0,2

Wasser: Aqua dest.

Sterilisation: Autoklav, 121°C, 15 Minuten

Zubereitung

Das Nährmedium wurde aus dem dehydratisierten Pulver/Granulat hergestellt. Zunächst wurde die abgewogene Trockensubstanz in der entsprechenden Wassermenge unter Rühren zur Lösung gebracht. Dann wurde der pH-Wert gemessen und ggf. korrigiert. Nach Abfüllen in die Endgefäße wurde das Nährmedium 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte eine erneute pH-Wert-Messung. Eine Übersicht über Kontrolle, Lagerung und Haltbarkeit des Nährmediums gibt die Tab. 10.

Physiologische Kochsalzlösung

Für den Nachweis der Beweglichkeit von *Campylobacter* spp. wurde das Verfahren des hängenden Tropfens eingesetzt. Dafür wurde Koloniematerial von Mueller-Hinton-Blutagar auf einem Objektträger in 10 µl isotonischer NaCl-Lösung verrieben und anschließend unter dem Phasenkontrastmikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung auf Beweglichkeit untersucht. Anstatt des Koloniematerials konnten auch 10 µl bebrütete Brucella-Bouillon für die Untersuchung auf Beweglichkeit verwendet werden.

Physiologische Kochsalzlösung (g/l Aqua bidest.)

Produkt: Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Art.-Nr. 9265) 8,5 g/l
 pH-Wert: keine Angabe
 Wasser: Aqua bidest.

Tab. 10: Kontrolle und Lagerung/Haltbarkeit der Nährmedien

Nährmedium	Kontrolle auf		Lagerung/Haltbarkeit (+2°C bis +8°C)
	Sterilität	optisch/physikalische Beschaffenheit	
Cary Blair	ja	wasserklar/halbfest	4 Wochen
Preston-Selektiv- Anreicherung	ja	blutrot/flüssig	1 Woche
Karmali	ja	schwarz/fest	4 Wochen
Mueller-Hinton- Blutagar	ja	kirschrot/fest	4 Wochen
Brucella-Bouillon	ja	klar-gelblich/flüssig	4 Wochen

3.1.2 Materialien zur Durchführung des in vitro Resistenztestes

Antibiotika-Testblättchen

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

3.1.3 Diagnostika und Reagenzien zur Identifizierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.

Gramfärbung

Die Gramfärbung diente zur optischen Identifizierung von *Campylobacter* spp. Dabei wurde auf Morphologie und Färbung (Gram-negativ) des Keimes geachtet. Hierfür kamen Karbolgentiana-Violettlösung (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.09218.), Lugolsche Lösung (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.09261.) und Ziehl-Neelsens Karbolfuchsinlösung (Merck, Darmstadt, Art.Nr.1.09215.) zum Einsatz.

Katalase-Reagenz

Zur weiteren Identifizierung wurde der Katalasetest durchgeführt. Bei positiver Reaktion bildeten *Campylobacter* spp. dabei Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid. Für die Herstellung wurde 35%iges H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.08600.) mit sterilem Aqua dest. auf eine 3%ige Lösung verdünnt.

Hippurathydrolyse

Der Hippurathydrolyse-Test diente zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. Das Natriumsalz der Hippursäure (Merck, Darmstadt Art.-Nr. 820648) wurde zunächst mit Aqua dest. zu einer 1%igen Lösung verdünnt. Anschließend erfolgte die Herstellung von Ninhydrin-Reagenz. Dafür wurden 3,5% Ninhydrin (Merck, Darmstadt Art.-Nr. 6762) in einer 1:1 Mischung aus Aceton und Butanol gelöst.

Indoxyl-Acetat-Hydrolyse

Der Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test (IAH) wurde zur weiteren Differenzierung von *Campylobacter* spp. angewendet. Für die Herstellung von IAH-Testblättchen wurden 10% Indoxyl-Acetat (Sigma[®], Art.-Nr. I-3500) in Aceton gelöst. Anschließend wurden Papierblättchen (6 mm Ø, Schleicher&Schuell, Art.-Nr. 2668) in der Lösung getränkt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.1.4 Material für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

3.1.4.1 PFGE Stamm- und Gebrauchslösungen

Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden folgende Stamm- und Gebrauchslösungen verwendet (siehe auch Anhangstabelle 1):

Stammlösungen

1 M Tris-HCl

-Tris-HCl, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

0,5 M EDTA

-EDTA Na₂ 2 H₂O, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

5 M NaCl

-NaCl, Aqua bidest.

0,5 x TBE-Puffer

-10 x TBE-Puffer

≅ Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (45 mM), Borsäure (45 mM), EDTA(1 mM),
Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

Gebrauchslösungen

Pett IV-Puffer

-1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 5 M NaCl, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

ESP-Puffer

-0,5 M EDTA, N-Laurylsarcosin (Sarkosyl), Proteinase K

TE-Puffer

-1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA, Aqua bidest., pH auf 8,0 einstellen

Stopplösung

-0,5 x TBE, Bromphenolblau (0,005%)

3.1.4.2 Chemikalien, Reagenzien, DNA-Marker und Restriktionsendonukleasen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Tabellen 11, 12 und 13 geben einen Überblick über die für die PFGE verwendeten Chemikalien, Reagenzien, DNA-Marker und Restriktionsendonukleasen.

Tab. 11: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für die PFGE

Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
Borsäure	Merck, Darmstadt, D	1.12015.0500
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D	1174.0005
Bovines Serum Albumin (BSA)	New England BioLabs Frankfurt am Main, D	B9001S
EDTA, Titriplex III	Merck, Darmstadt, D	1.08418.1000
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D	111608
InCert-Agarose	FMC BioProducts, Rockland, USA	850123
NaCl	Merck, Darmstadt, D	1.01540.0500
Proteinase K	Boehringer, Mannheim, D	1092766
Sarkosyl (N-Laurylsarcosin)	Sigma Chemie GmbH Deisenhofen, D	L-5125
SeaKem GTG Agarose	FMC BioProducts, Rockland, USA	850070
Tris-HCL	Merck, Darmstadt, D	108219
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, D	1.01549.0500

Tab. 12: Verwendete Restriktionsendonukleasen für die PFGE

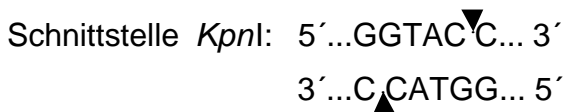
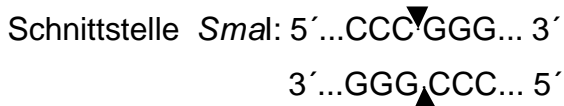
Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
<i>Sma</i> I	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D	R0141S
<i>Kpn</i> I	New England BioLabs, Frankfurt am Main, D	R0142S

Tab. 13: Verwendete DNA-Marker für die PFGE

Substanzen	Firma	Artikel-Nummer
<i>C. coli</i>	http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html	CNET 068
Lambda Ladder PFG Marker	New England BioLabs, D	NO340S

Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden der DNA wurden die Restriktionsenzyme SmaI (gewonnen aus einem *E. coli*-Stamm, der das geklonte *SmaI*-Gen von *Serratia marcescens* trägt) und KpnI (gewonnen aus einem *E. coli*-Stamm, der das geklonte *KpnI*-Gen von *Klebsiella pneumoniae* trägt) verwendet.



PFGE- Marker

Zur Größenbestimmung (50-1000kb) wurde der Lambda Ladder PFG Marker eingesetzt. Der *C. coli* Stamm CNET 068 diente als Normalisierungs-Standard.

3.1.5 Arbeitsgeräte

3.1.5.1 Arbeitsgeräte für die Probenahme

Für die Entnahme von Tupferproben in der Geflügelmast und -schlachtung wurden sterile Abstrichbestecke (greiner bio-one, Kat.-Nr. 421161) und sterile Einmalhandschuhe (Flexam, Allegiance) verwendet. Der Transport der Halshaut- und Flüssigkeitsproben erfolgte in sterilen Weithalsflaschen (VWR, Art.-Nr. 215H7101). Alle Proben wurden gekühlt bei 4-6°C in einer thermoelektrischen Kühlbox (Waeco, Tropicool® Classic TC-32) bis zur Aufarbeitung im Labor gelagert. Temperaturen wurden mit einem geeichten digitalen Sekunden-Thermometer (Testoterm, testo 112), pH-Werte mit einem geeichten pH-Meter (Knick, Portamess® 651-2) ermittelt.

3.1.5.2 Arbeitsgeräte für Aufarbeitung und mikrobiologische Untersuchung der Proben

Die Proben wurden in einem Labor mit der üblichen Ausstattung (Brutschränke, Kühlschränke, Sterilisator, Waage, Mikroskop, Gasbrenner, Glaswaren,

Meßpipetten, kleine Petrischalen, Spatel, Impfösen) aufgearbeitet. Proben aus der Schlachtung (Magen, Leber, Herz, Schlachtkörper) wurden mit Hilfe einer Sartorius Waage (Typ AC 121S) eingewogen und in einem Stomacher-Gerät (Lab Blender, Model 4000) homogenisiert. Für die anaerobe Bebrütung wurde ein begasbarer Brutschrank (CO₂ Brutschrank CB 210) mit einer generierten Atmosphäre von 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ verwendet. Neben begasbaren Brutschränken wurden auch Anaerobiertöpfe (Becton Dickinson, BBL™ GasPak™ Anaerobic Systems) mit Gasentwicklern (Becton Dickinson, Campy Pak Plus™, Art.-Nr. 271045) in Kombination mit Kühl-Brutschränken (Heraeus, BK 6160) benutzt. Des weiteren kamen Reagenzglasmixer (neoLab®, Vortex), Stereomikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss, Axiostar plus) sowie ein temperiertes Wasserbad (GFL®) für die mikrobiologischen Untersuchungen zum Einsatz. In der Stammsammlung wurden die isolierten Stämme in Ultra-Tiefkühlschränken (Heraeus, HFU 586) bei -80°C aufbewahrt.

3.1.5.3 Arbeitsgeräte für die PFGE

Für das Einstellen der Zelldichte wurde ein Densimat (bioMérieux, ID N006411) benutzt. Die Blöckchen wurden in Gießformen (BioRad, Plug Mold 170-3706) hergestellt und in Zentrifugenröhrchen (Nunc, 373660) aufbewahrt. In weiteren Arbeitsschritten zur Vorbereitung der PFGE wurden unter anderem Kühlbox (Eppendorf, IsoTherm®-System), Wasserbad (GFL, 1008), Schüttelwasserbad (GFL, 1083), Thermostat (Eppendorf, 5320), Magnetrührer mit Heizplatte (Heidolph, MR 3001) und Metallblock-Thermostat (Bioblock Scientific, 92333) eingesetzt. Mit einer CHEF DR-III Elektrophoreseeinheit (BioRad Laboratories) wurde anschließend die Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit einer CCD-Kamera (Ift Labortechnik, Bio-Profil-System) fotografiert, computergestützt mit einer Aufnahmesoftware (Ift-Labortechnik, Bio-Capt/Photo-Capt) dokumentiert und mit der Software GelComparII™ Version 3.0 (Applied Maths BVBA, Belgien) ausgewertet.

3.2 Methode

3.2.1 Versuchsplan und Versuchsdurchführung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. bei Mastgeflügel sowie Verfolgung herdenspezifischer Stämme in der Aufzucht (Mast) über die Schlachtung bis hin zum Endprodukt und ihrer molekularbiologischen Feintypisierung.

Dazu wurden Kottupfer aus deutschen Hähnchenmastbeständen entnommen und auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht. Bei *Campylobacter* – positiven und ausgewählten negativen Herden erfolgte eine weitere Beprobung im Schlachthof an den einzelnen Schlachtstationen bis hin zu den Endprodukten.

Im Labor wurden die Isolate nach Aufarbeitung der Proben zunächst biochemisch identifiziert und differenziert. Ausgewählte Stämme wurden dann mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) feintypisiert.

3.2.1.1 Versuchsdurchführung in den Hähnchenmastbetrieben

Von Dezember 2001 bis August 2002 wurden von 51 Herden insgesamt n=510 Kottupfer aus 3 Hähnchenmastbetrieben (Mastbetrieb A, B, C) im Raum Brandenburg entnommen. Alle Proben wurden auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht und nach Reihenfolge des Probenahme-Zeitpunktes durchnummeriert. Aus zeitlichen und personellen Gründen konnten in direkt aufeinanderfolgenden Mastperioden nur die 4 Ställe des Mastbetriebes B beprobt werden (6 Mastdurchläufe). Als Herde bzw. epidemiologische Einheit wurde die in einer ummauerten Stalleinheit gehaltene Tiergruppe gewertet. Abhängig von der Dauer der Mastperiode fand die Probenahme zwischen dem 25. und 35. Masttag und damit ca. 1 Woche vor Schlachtung oder später statt. Am Probenahmetag wurden pro Herde jeweils 10 Tupfer von frisch abgesetztem Blinddarmkot (brauner, feuchter, glänzender Kotanteil) mit sterilen Einmaltupfern entnommen. Hierbei wurde davon ausgegangen, daß die Konzentration der *Campylobacter* spp. im Blinddarmkot von kolonisierten Tieren mindestens 10^4 KbE/g beträgt.

Es ist darauf geachtet worden, daß kein Harn mit dem Tupfer aufgenommen wurde, um eine bakterizide Wirkung durch die Harnsäure zu verhindern.

Die Kottupferprobenahme erfolgte jeweils pro Herde und Stall 3x im vorderen Eingangsbereich (1x linker Bereich, 1x mittlerer Bereich und 1x rechter Bereich), 4x im mittleren Stallbereich (1x linker Bereich, 2x mittlerer Bereich und 1x rechter Bereich) und 3x im hinteren Stallbereich (1x linker, 1x mittlerer und 1x rechter Bereich). Insgesamt wurden mindestens ca. 10g Kot mit sterilen Einmaltupfern pro Stall und Herde gewonnen. Direkt nach Probenahme wurden die Kottupfer immer einzeln in sterile Reagenzgläser mit Transportmedium verbracht. Anschließend wurden diese gekühlt bei 4-6°C in einer Kühlbox in das *Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin*, transportiert und am gleichen Tag in Anlehnung an eine einheitliche Methodenvorschrift (ISO 10272) und unter Verwendung identischer Nährmedien im Labor aufgearbeitet (Abb. 5, S. 83). Bei positiven Tupferproben wurde jeweils pro Tupfer ein Isolat gewonnen.

Um eine Keimverschleppung zu vermeiden, wurden jeweils vor Betreten des Stalles Stiefel und Kittel gewechselt und eine Stiefeldesinfektion an den am Stalleingang befindlichen Desinfektionsmatten durchgeführt. Pro Tupferprobe wurden die Einmalhandschuhe gewechselt, um eine Kontamination durch die eigenen Hände zu vermeiden. Alle beprobten Herden wurden in dem gleichen EG-zugelassenen Geflügelschlacht und -zerlegungsbetrieb geschlachtet.

3.2.1.1.1 Struktur der Hähnchenmastbetriebe

Von den drei Mastbetrieben arbeiteten zwei nach dem Rotationsverfahren und einer nach dem Rein-Raus-Prinzip. In Betrieben, bei denen das Rotationsverfahren angewendet wurde, erfolgte nach Ausstallung und Serviceperiode wieder eine neue Einstellung von Eintagsküken. Es befanden sich daher bei diesen Mastbetrieben verschiedene Altersgruppen auf dem Gelände.

Die Mastperiode setzte sich aus der jeweiligen Mastdauer von 37-42 Tagen und anschließender Serviceperiode von 10 Tagen zusammen, in der die Ställe gereinigt und desinfiziert sowie die Einstreu gewechselt wurde. Eine Übersicht über die verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittel ist in der Anhangstab. 2 dargestellt. Alle Herden wurden in geschlossener Stallhaltung gemästet.

Tab. 14: Auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersuchte Mastanlagen im Raum Brandenburg

Mastanlage	Anzahl untersuchte Herden	Alter bei Einstallung	Rasse	Herkunft der Elterntiere	Mastdauer	Dauer Serviceperiode	Reinigung/ Desinfektion	Einstreu	Futter	Herkunft Tränkwasser
A	21	1 Tag	Cobb/Ross	Niederlande	38-42 Tage	10 Tage	Wasser/Sorgene-Begasung	Hobel-späne	Pellet	eigener Brunnen
B	24	1 Tag	Cobb/Ross	Niederlande	37-38 Tage	10 Tage	Wasser/Formalin-Begasung	Stroh/Hobel-späne	Pellet	eigener Brunnen
C	6	1 Tag	Ross	Niederlande	38-39 Tage	10 Tage	Wasser/Sorgene-Begasung	Stroh	Pellet	eigener Brunnen

Hähnchenmastbetrieb A

Im Mastbetrieb A wurden insgesamt 21 Geflügelherden auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht, davon 5 Herden im Januar, 4 Herden im März, 3 Herden im April, 7 Herden im Mai und 2 Herden im Juni 2002 (Tab. 15). Der Mastbetrieb bestand aus 12 Hallen, die insgesamt 15 Ställe beherbergten. Pro Stall war eine Herde untergebracht. Die Herdengröße lag im Bereich von 21.780 bis 29.700 Tieren. Eingestallt wurde nach dem Rotationsverfahren. Weitere Angaben über Rasse, Einstaltungsalter, Herkunft der Elterntiere, Mastdauer, Fütterung, Tränkung, Dauer der Serviceperiode sowie Reinigung und Desinfektion enthält die Tabelle 14.

Während der Serviceperiode wurden die Ställe (Fußboden, Wände, Decke, Lüftung) erst mit einem Hochdruckreiniger mit heißem Leitungswasser (ca. 75°C) bei 65 bar gereinigt und anschließend mit Sorgene-Begasung (Ohlsen) 24 Stunden desinfiziert. Fütterungs- und Tränkeinrichtungen wurden vor der Begasung mit kaltem Leitungswasser gespült. Im Eingangsbereich der Ställe befanden sich Desinfektionsmatten. Vor Betreten einzelner Ställe wurden Stiefel und Kittel vom Personal gewechselt. Die Luftzufuhr der Ställe erfolgte über eine Unterdrucklüftung (Quer- und Abluftschachtlüftung).

In diesem Mastbetrieb wurde neben der üblichen Probenahme im Juni 2002 eine einmalige Untersuchung des hauseigenen Brunnenwassers (100 ml) auf *Campylobacter* spp. durchgeführt. Darüber hinaus wurden in 5 Ställen (Nr. 1-5) nach Reinigung und Desinfektion stichprobenartig jeweils 10 Oberflächentupfer vom Stallboden im Eingangs-, Tränken-, Lüftungs- und Futtertrogbereich sowie im vorderen, mittleren und hinteren Stallbereich entnommen.

Tab. 15: Übersicht über Herdengröße, Mastdauer, Zeitraum der Probenentnahme und Probenanzahl im Hähnchenmastbetrieb A

Herde	Anzahl Tiere	Mastdauer	Zeitraum Probenentnahme	Anzahl Kottupfer
2	21.960	38 Tage	Januar 02	10
4	21.780	40 Tage	Januar 02	10
6	21.780	39 Tage	Januar 02	10
7	21.780	38 Tage	Januar 02	10
9	21.960	39 Tage	Januar 02	10
11	29.340	38 Tage	März 02	10
12	29.340	40 Tage	März 02	10
14	29.520	39 Tage	März 02	10
15	29.520	39 Tage	März 02	10
1	25.020	38 Tage	April 02	10
2	25.020	39 Tage	April 02	10
3	25.020	39 Tage	April 02	10
9	29.700	39 Tage	Mai 02	10
10	29.700	39 Tage	Mai 02	10
11	29.700	39 Tage	Mai 02	10
12	29.700	40 Tage	Mai 02	10
13	28.440	40 Tage	Mai 02	10
14	28.440	40 Tage	Mai 02	10
15	28.440	40 Tage	Mai 02	10
5	21.960	40 Tage	Juni 02	10
8	21.870	38 Tage	Juni 02	10
Summe				210

Hähnchenmastbetrieb B

Im Mastbetrieb B wurden insgesamt 24 Geflügelherden in 6 direkt aufeinanderfolgenden Mastperioden beprobt. Alle 4 Herden der Anlage wurden im Dezember 2001, sowie jeweils im Februar, März, Mai, Juli und im August 2002 auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht (Tab. 16). Der Mastbetrieb bestand aus 4 Ställen mit jeweils einer Herde pro Stallanlage. Dabei lag die Herdengröße zwischen 14.580 und 22.300 Tieren. Der Mastbetrieb wurde nach dem Rein-Raus-Prinzip bewirtschaftet. Weitere Angaben zur Haltung enthält die Tab. 14.

Zur Reinigung (Hochdruckreiniger mit 70 bar) der Ställe wurde heißes Leitungswasser (ca. 50°C) verwendet und anschließend mit Formalin 24 Stunden desinfiziert. Fütterungs- und Tränkeinrichtungen wurden innen mit kaltem und außen mit warmem Leitungswasser gereinigt. Die Tränken wurden zusätzlich desinfiziert (Ewabo Systemclean). Vor jedem Stalleingang befanden sich Desinfektionsschüsseln (Wofasept®). Stiefel und Kittel wurden vom Personal nicht gewechselt. Die Luftzufuhr der Ställe erfolgte über eine Unterdrucklüftung (Ab-luftschachtlüftung).

Tab. 16: Übersicht über Herdengröße, Mastdauer, Zeitraum der Probenentnahme und Probenanzahl im Hähnchenmastbetrieb B

Herde	Anzahl Tiere	Mastdauer	Zeitraum Probenentnahme	Anzahl Kottupfer
1	22.300	38 Tage	Dezember 01	10
2	22.300	38 Tage	Dezember 01	10
3	22.300	37 Tage	Dezember 01	10
4	15.800	37 Tage	Dezember 01	10
1	21.960	37 Tage	Februar 02	10
2	21.960	38 Tage	Februar 02	10
3	21.960	38 Tage	Februar 02	10
4	15.480	37 Tage	Februar 02	10
1	21.600	37 Tage	März 02	10
2	21.600	38 Tage	März 02	10
3	21.600	38 Tage	März 02	10
4	15.480	37 Tage	März 02	10
1	21.600	38 Tage	Mai 02	10
2	21.600	37 Tage	Mai 02	10
3	21.600	37 Tage	Mai 02	10
4	14.600	38 Tage	Mai 02	10
1	21.780	38 Tage	Juli 02	10
2	21.780	38 Tage	Juli 02	10
3	21.780	37 Tage	Juli 02	10
4	14.580	37 Tage	Juli 02	10
1	21.420	37 Tage	August 02	10
2	21.420	38 Tage	August 02	10
3	21.420	38 Tage	August 02	10
4	14.940	37 Tage	August 02	10
Summe				240

Hähnchenmastbetrieb C

Im Mastbetrieb C wurden 6 Geflügelherden im März 2002 auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht (Tab. 17). Die Anlage bestand aus 6 Hallen mit jeweils 2 Ställen und zugehörigen Herden. Dabei lag die Anzahl der Tiere zwischen 14.000 und 22.500 pro Herde. Die Mastanlage wurde nach dem Rotationsverfahren bewirtschaftet. Weitere Angaben zur Haltung enthält die Tab. 14.

Die Ställe wurden mit kaltem Leitungswasser (Hochdruckreiniger mit 240 bar) gereinigt und anschließend mit Sorgene-Begasung 24 Stunden desinfiziert. Fütterungs- und Tränkeinrichtungen wurden mit kaltem Leitungswasser vor der Begasung gespült. An den Stallzugängen befanden sich Desinfektionsmatten. Schuhe und Kittel wurden vom Personal vor Betreten der Ställe gewechselt. Die Luftzufuhr der Ställe erfolgte mit einer Überdrucklüftung.

Tab. 17: Übersicht über Herdengröße, Mastdauer, Zeitraum der Probenentnahme und Probenanzahl im Hähnchenmastbetrieb C

Herde	Anzahl Tiere	Mastdauer	Zeitraum Probenentnahme	Anzahl Kottupfer
1	22.500	38 Tage	März 02	10
2	22.500	38 Tage	März 02	10
3	14.000	39 Tage	März 02	10
4	14.000	39 Tage	März 02	10
5	14.000	38 Tage	März 02	10
6	14.000	38 Tage	März 02	10
Summe				60

3.2.1.2 Versuchsdurchführung im Geflügelschlacht und –zerlegungs- betrieb

Im Zeitraum von Dezember 2001 bis August 2002 wurden 14 ausgewählte *Campylobacter*-positive und 8 *Campylobacter*-negative Hähnchenherden der Mastbetriebe A, B und C in der Schlachtung beprobt (Tab. 18). Die Auswahl der Geflügelherden richtete sich nach den Schlachtterminen. Insgesamt belief sich die Probenanzahl auf n=1101 Proben (Tab. 22, S. 84). Die Probenahme erfolgte an 6 festgelegten Schlachtstationen (Kistenreinigung, Betäubung, Brüher, Eviszation, Kühlung, Verpackung) vor, während und nach der Schlachtung. Für die Probenahme wurden Stationen der Schlachtkette ausgewählt, an denen eine Kreuzkontamination durch zuvor geschlachtete *Campylobacter*-positive Herden möglich erschien.

Vor der Schlachtung wurden folgende Stationen beprobt: 1. Transportkistenwaschwasser vor Reinigung und Desinfektion der Kisten (Probenahme erfolgte nur teilweise); 2. Transportkisten vor und nach Reinigung und Desinfektion; 3. Betäubungsbad (Probenahme erfolgte nur teilweise); 4. Brühbad (Probenahme erfolgte nur teilweise); 5. Leber-Magen-Wanne (Probenahme erfolgte nur teilweise).

Während der Schlachtung wurden folgende Stationen beprobt: 1. Schlachtkörper direkt nach Brühen; 2. Eviszation (Probenahme erfolgte nur teilweise); 3. Schlachtkörper direkt nach Luftkühlung; 4. Endprodukt.

Nach der Schlachtung wurden folgende Stationen beprobt: 1. Transportkistenwaschwasser nach Reinigung und Desinfektion der Kisten; 2. Betäubungsbad (Probenahme erfolgte nur teilweise); 3. Brühbad; 4. Leber-Magen-Wanne (Probenahme erfolgte nur teilweise).

Eine Übersicht über die einzelnen Probenahme-Stationen liefert die Abb. 4 (S. 76). Für Verfolgsuntersuchungen herdenspezifischer *Campylobacter*-Stämme durch die gesamte Schlachtung bis hin zum Endprodukt und mögliche Nachweise von Kreuzkontaminationen innerhalb der Schlachtkette wurden immer 2 Herden in direkt aufeinanderfolgender Schlachtung beprobt. Dabei war die erste beprobte Herde auch immer die erste in der Schlachtung des jeweiligen Schlachttag.

Bei jeder Probenahme wurden neue Einmalhandschuhe verwendet, um eine Kontamination durch die eigenen Hände zu vermeiden. Tupferproben wurden

mit sterilen Abstrichbestecken genommen und direkt in Reagenzgläser mit Transportmedium verbracht. Anschließend wurden die Reagenzgläser mit Metallkappen verschlossen. Proben von Flüssigkeiten wurden in sterile Weithalsflaschen überführt. Die Flaschen wurden anschließend mit Schraubverschlüssen geschlossen. Alle entnommenen Proben wurden in Kühltaschen bei 4-6°C gelagert. Sie wurden am gleichen Tag in das *Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)* transportiert und dort sofort im Labor aufgearbeitet.

Tab. 18: Hähnchenherden der Mastbetriebe A, B und C, die zusätzlich vor, während und nach der Schlachtung auf das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. untersucht wurden

Monat	Dez		Jan	Feb	Mrz	Mai		Jun	Juli	Aug	
	01	02	02	02		02		02	02	02	
Betriebe	B	A	B	C	B	A	B	A	A	B	B
C.-positive Herden (Nr.)					1,4	11,15	2,3	12,13	5,8	3,4	1,4
C.-negative Herden (Nr.)	2,4	2,4	1,4	1,5							

C.= *Campylobacter*

3.2.1.2.1 Struktur des Geflügelschlacht und -zerlegungsbetriebes

Der Schlachtbetrieb existierte seit 1970 im Raum Brandenburg und wurde in seiner Folgezeit mehrmals vergrößert und modernisiert.

Er untergliederte sich in 2 Bereiche: Die unreine Seite mit Anlieferungsbereich und Schlachtraum sowie die reine Seite mit Eviszerations-, Kühl- und Zerlegungsraum. Geschlachtet wurde 5 Tage in der Woche mit einer durchschnittlichen Schlachtkapazität von ca. 50.000 Tieren pro Tag. Das Mastendgewicht lag bei 1750 g - 2000 g. Alle beprobten Mastbetriebe waren Zulieferer des Schlachthofes. Das Einzugsgebiet hatte einen Radius von ca. 100 km mit einer durchschnittlichen Anfahrtszeit von ca. 60 -120 Minuten.

Bei den technischen Daten des Schlachtbetriebes sind Brüh- und Kühlverfahren hervorzuheben. Die Hähnchenkarkassen wurden im Tauchbrühverfahren mit einer Dauer von 240 Sekunden bei einer angegebenen Temperatur von ca. +53°C, dem sogenannten Niedrigbrühverfahren, gebrüht. Gekühlt wurde mittels Luftkühlung mit einer durchschnittlichen Luftgeschwindigkeit von 4 m/s. Zunächst wurde der Schlachtkörper bei -6°C abgekühlt, gefolgt von einer Trock-

nung bei -2°C . Im letzten Tunnel lagen 0°C zwecks Aufrechterhaltung der Kühltemperatur im Schlachtkörper vor. Die Betäubung erfolgte im Naßkontaktverfahren (stromführendes Wasserbad) bei ca. 0,7 A und 40 V (Tab. 19).

Die Reinigung und Desinfektion wurde mit saurem Reiniger (P3-topax 56) in Kombination mit neutralem Desinfektionsmittel (P3-topax 91) sowie mit alkalischem Reiniger (P3-topax 66) in Kombination mit alkalischem Desinfektionsmittel (P3-topax 95) jeweils im Tageswechsel durchgeführt. Eine Aufstellung der in der Schlachtung verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittel liefert die Anhangstab. 2.

Tab. 19: Technische Daten Geflügelschlachthof

Betäubung	Verfahren: Naßkontakt	Einwirkzeit: 10 sec.	Stromstärke: 0,7 A	Spannung: 40 V
Entblutung	Verfahren: Halsschnitt	Entblutezeit: 180 sec.		
Brühen	Verfahren: Tauchbrühen	Dauer: 240 sec.	Temperatur: 53°C - 54°C (Niedrigbrühen)	
Rupfen	Verfahren: Naßrupfen	Dauer: 30 sec.		
Kühlung	Verfahren: Luftkühlung	Dauer: Tunnel 1: 30 min Tunnel 2: 30 min Tunnel 3: 30 min	Temperatur: -6°C (Kühlung) -2°C (Trocknung) 0°C (Temperatur halten)	Luftgeschw.: 4 m/s
Tierkörper	Widmung: Frischware	Epidermis: erhalten		

3.2.1.2.2 Probenahmestationen und Art des Probenmaterials innerhalb der Schlachtkette

A. Anlieferungsbereich

Kistenreinigung

Transportkistenwaschwasser

Mit sterilen Einmalspritzen wurden 100 ml Transportkistenwaschwasser vor Schlachtbeginn, 100 ml nach Reinigung/Desinfektion von Transportkisten der ersten Herde und 100 ml nach Durchlauf der zweiten Herde aus der Kistenwaschanlage entnommen und in sterile Aufbewahrungsgefäße gefüllt. Zusätzlich wurde der pH-Wert und die Temperatur der Reinigungsflüssigkeit vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden gemessen.

Transportkisten

Es wurden jeweils bei der ersten Herde 10 und bei der zweiten Herde 5-10 Transportkisten direkt nach Entleerung (vor Reinigung/Desinfektion), sowie nach Reinigung und Desinfektion beprobt. Bei jeder einzelnen Probenahme wurde der Transportkistenboden mit 2 sterilen Tupfern mäanderförmig ausgestrichen. Anschließend wurden die Tupfer in sterile Reagenzröhrchen mit Transportmedium verbracht. Im Labor wurden jeweils die 2 Tupferproben zu einer Probe gepoolt.

B. Schlachtraum

Betäubung

Betäubungsbad

Es wurden jeweils 100 ml Wasser aus dem Betäubungsbad vor Schlachtbeginn, nach Durchlauf der ersten Herde und nach Durchlauf der zweiten Herde mit sterilen Einmalspritzen gewonnen und in sterile Aufbewahrungsgefäße gefüllt. Außerdem wurde sowohl der pH-Wert, als auch die Temperatur des Wassers vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden gemessen.

Brühtank

Brühwasser

Es wurden jeweils 100 ml Brühwasser vor Schlachtbeginn, nach Brühen der ersten Herde und nach Brühen der zweiten Herde aus dem Brühkessel (am Kesselausgang) gewonnen. Die Probenflüssigkeit wurde mit sterilen Einzelspritzen entnommen und in sterile Aufbewahrungsgefäße gefüllt. Zusätzlich wurde der pH-Wert, sowie die Temperatur des Brühwassers vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden gemessen.

Tierkörper nach Brühprozeß

Direkt nach dem Brühen wurden 10 Tiere der ersten Herde und 5 Tiere der zweiten Herde beprobt. Dabei wurde jeder Tierkörper mit jeweils 2 sterilen Tupfern im Hals-, Brust-, Flügel-, Innenschenkel- und Rückenbereich abgestrichen. Zur Aufbewahrung wurden die Tupfer in sterile Reagenzröhrchen mit Transportmedium verbracht.

C. Eviszerationsraum

Leber-Magen-Wanne

Vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf von erster und zweiter Herde wurden jeweils 100 ml Prozeßwasser aus der Leber-Magen-Wanne mit sterilen Einzelspritzen entnommen und in sterile Aufbewahrungsgefäße gefüllt. Darüber hinaus wurde der pH-Wert, sowie die Temperatur des Wassers vor Schlachtung und nach Durchlauf der Herden gemessen.

Innereien

Von erster und zweiter Herde wurden jeweils 250 g Leber, 250 g Magen und 250 g Herz entnommen. Die beprobten Chargen waren frisch abgepackt und fertig für den Handel. Von den Organen wurde zudem noch der pH-Wert gemessen.

Blinddärme

Nach Öffnung der Bauchhöhle wurden bei 10 Tieren jeder Herde die Blinddärme vom restlichen Organkonvolut getrennt und einzeln in sterile Kunststoffbeutel verpackt.

D. Kühlraum

Luftkühlung

Direkt im Anschluß an die Luftkühlung wurden jeweils bei der ersten Herde 10 und bei der zweiten Herde 5 Tiere beprobt. Dabei wurden jeweils ca. 25 g Halshaut mit einem sterilen Skalpell vom Tierkörper abgesetzt und in Aufbewahrungsgefäße (gefüllt mit 100 ml Preston-Bouillon) verbracht.

E. Verpackung

Endprodukt

Von erster und zweiter Herde wurden jeweils 5 Schlachtkörper entnommen. Diese waren ohne Innereien, frisch abgepackt und fertig für den Handel. Zusätzlich wurden pH-Wert und Temperatur (Unterhaut) gemessen.

Anmerkungen zur Abb. 4:

- 1 Beprobung von: -Transportkisten vor und nach Reinigung/Desinfektion
-Transportkistenwaschwasser vor Schlachtbeginn und nach Reinigung/Desinfektion der Transportkisten
- 2 Beprobung von: - Betäubungsbad vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden
- 3 Beprobung von: - Hähnchenkarkassen nach Brühprozess
- Brühwasser vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden
- 4 Beprobung von: - Innereien (Leber, Magen, Herz)
- Blinddärmen
- Wasser aus Leber-Magen-Wanne vor Schlachtbeginn und nach Durchlauf der Herden
- 5 Beprobung von: - Hähnchenkarkassen (Halshaut) nach Luftkühlung
- 6 Beprobung von: -Endprodukt (Tierkörper, ausgenommen, gewogen und verpackt)

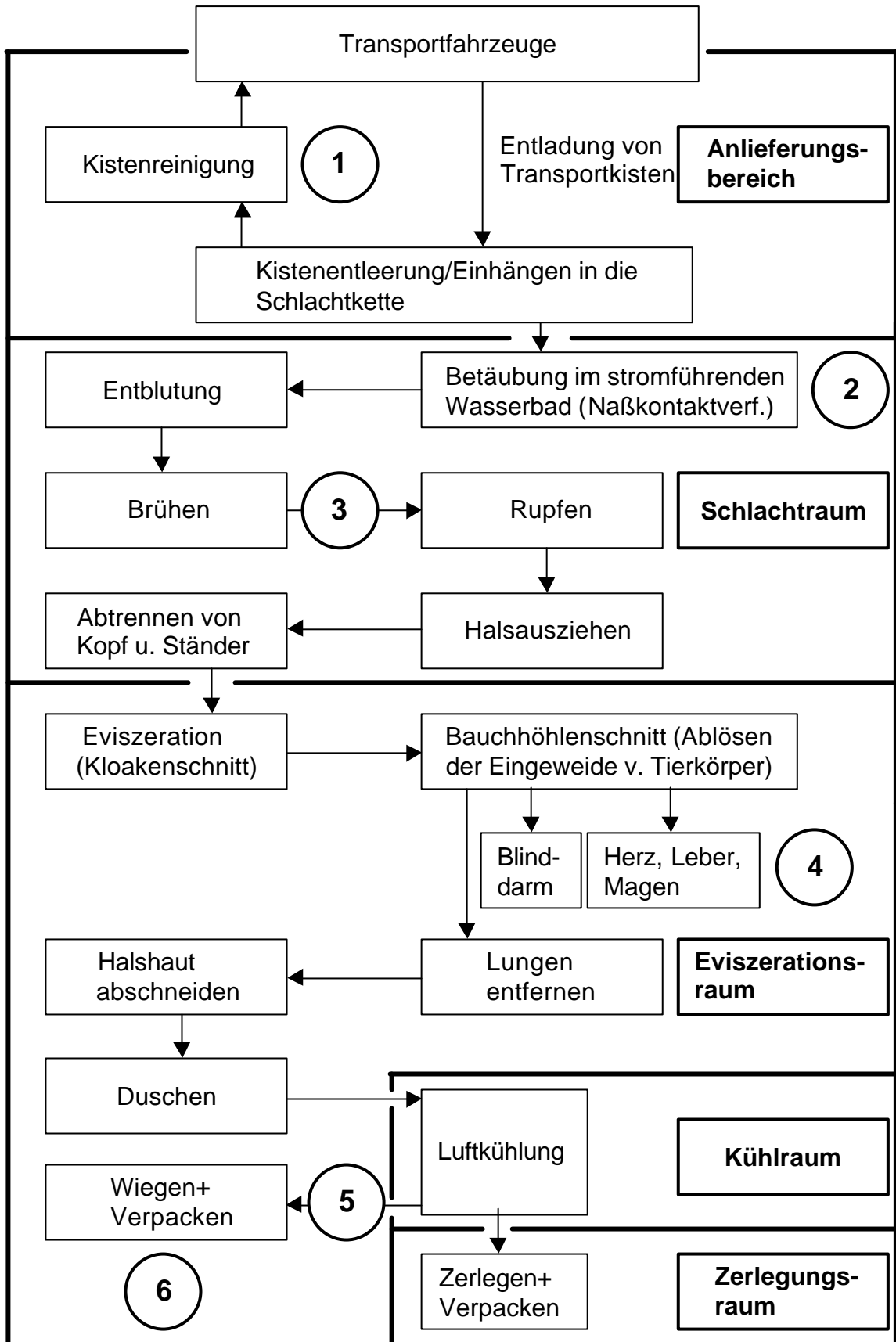


Abb. 4: Geflügelschlachtung (Fließschema) mit Lokalisationen der Probenahme-Stationen

3.2.2 Probenaufarbeitung

3.2.2.1 Proben aus den Geflügelmastbetrieben

Im Labor wurden die Kottupfer einzeln mit sterilen Pinzetten den Reagenzgläsern mit Transportmedium entnommen und in mit 10 ml selektiver Preston-Anreicherungsbouillon gefüllte Reagenzgläser überführt. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Tupfer bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) im begasbaren Brutschrank. Die zusätzlichen Tupferproben (Oberflächentupfer vom Stallboden) aus Mastbetrieb A wurden ebenfalls in 10 ml selektive Preston-Anreicherungsbouillon für 24 Stunden bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen im begasbaren Brutschrank inkubiert. Von den 100 ml Brunnenwasser aus Mastbetrieb A wurden 10 ml mit sterilen Meßpipetten in einen mit 90 ml (1:10) selektiver Preston-Anreicherungsbouillon gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend ebenfalls 24 Stunden bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen im begasbaren Brutschrank inkubiert.

3.2.2.2 Proben aus dem Geflügelschlachtbetrieb

Von Transportkistenwaschwasser, Betäubungsbad, Brühwasser und Wasser aus der Leber-Magen-Wanne wurden jeweils 10 ml Flüssigkeit mit sterilen Meßpipetten in Erlenmeyerkolben mit 90 ml (1:10) selektiver Preston-Anreicherungsbouillon überführt. Die Kolben wurden dann für 24 Stunden bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) im begasbaren Brutschrank inkubiert. Tupferproben wurden einzeln in mit 10 ml selektiver Preston-Anreicherungsbouillon gefüllte Reagenzgläser verbracht und anschließend für 24 Stunden bei 42°C mikroaerob im begasbaren Brutschrank bebrütet.

Von Herz, Leber und Magen wurden jeweils 25 g aus der Verpackung entnommen und einzeln in sterilen Kunststoffbeuteln eingewogen. Anschließend wurde eine Teilmenge von 225 ml selektiver Preston-Anreicherungsbouillon hinzugegeben. Zusammen mit der Anreicherung wurden die Innereien im Beutel für ca. 30 Sekunden per Hand abmassiert. Die Spülflüssigkeit wurde dann ohne Innereien in die restliche Anreicherung zurückgegossen (Organ-spülprobe). Diese wurde für 24 Stunden bei 42°C mikroaerob bebrütet. Herz,

Magen und insbesondere die Leber wurden nicht mit bebrütet, um eine Übersäuerung der Anreicherung zu vermeiden, wodurch das Wachstum von *Campylobacter* spp. behindert worden wäre.

Die Blinddärme wurden zunächst an den Spitzen mit einem sterilem Skalpell eröffnet. Mit sterilen Einmaltupfern wurde dann jeweils beiden Blinddarmspitzen Kot entnommen. Es folgte eine 24-stündige mikroaerobe Bebrütung der Tupfer in jeweils 10 ml selektiver Anreicherungsbouillon.

Die Aufbewahrungsgefäße mit den Halshäuten wurden geöffnet und mit Aluminiumfolie abgedeckt 24 Stunden bei 42°C mikroaerob im begasbaren Brutschrank inkubiert.

Von den Tierkörpern wurden jeweils insgesamt 25 g Haut im Hals-, Brust-, Flügel- (Propatagium) und Schwanzbereich abpräpariert und in sterilen Kunststoffbeuteln eingewogen. Von 225 ml selektiver Preston-Anreicherungsbouillon wurde eine Teilmenge zu den Beuteln hinzugegeben.

Die Proben wurden dann 60 Sekunden im Beutel-Walkmischgerät unter normaler Geschwindigkeit homogenisiert und anschließend in die restliche Anreicherung zurückgegossen. In Erlenmeyerkolben verbracht und mit Aluminiumfolie abgedeckt erfolgte eine 24-stündige mikroaerobe Bebrütung der Proben bei 42°C.

3.2.3 Isolierung, Identifizierung und Speziesdifferenzierung der *Campylobacter*-Stämme

3.2.3.1 Isolierung

Nach 24-stündiger Bebrütung wurden 10 µl mit steriler Einmalöse aus der jeweiligen Anreicherungsbouillon entnommen und auf selektiven Karmali-Agar ausgestrichen. Danach wurden die Platten für 48 Stunden bei 42°C mikroaerob bebrütet. Zur Reinzüchtung und weiteren Identifizierung erfolgte anschließend eine Subkultivierung von *Campylobacter*-verdächtigen Einzelkolonien auf Mueller-Hinton-Blutagar. Dazu wurde mit einer Platinöse eine verdächtige Einzelkolonie von Karmali-Agar auf Mueller-Hinton-Blutagar (MHB-Agar) überimpft und dieser weitere 24 Stunden unter gleichen Bedingungen bebrütet.

Campylobacter-verdächtige Kolonien zeichneten sich durch ein flach bis konvexes, glattes, graues, z.T. silbrig glänzendes, leicht mukoides Aussehen

aus. Sie hatten meist ein rundes, zartes Wachstum mit Tendenz zum Schwärmen (abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt des Nährbodens).

Nach Bebrütung der MHB-Platten wurden die erhaltenen Reinkulturen für die Identifizierung und Differenzierung verwendet, d.h. es wurde zunächst der Katalasetest, eine Gram-Färbung und eine Überimpfung in 5 ml Brucella-Bouillon durchgeführt. Anschließend erfolgte eine weitere 24-stündige mikroaerobe Bebrütung der MHB-Platten und Brucella-Bouillon bei 42°C. Mit den kräftiger gewachsenen Reinkulturen auf den MHB-Platten wurden dann der Hippurathydrolyse- sowie Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test durchgeführt. Die Brucella-Bouillon diente der Untersuchung auf Beweglichkeit sowie nach Bebrütung als Ausgangsmedium für den Test auf Nalidixin-/Cephalothinempfindlichkeit und Wachstum bei 25°C und 43°C.

3.2.3.2 Identifizierung und Speziesdifferenzierung

Eine Auflistung der wichtigsten Differenzierungsmerkmale zeigt die Tab. 20. Der Untersuchungsgang zur Isolierung und Identifizierung von thermophilen *Campylobacter* spp. ist in der Abb. 5 dargestellt. Es wurden folgende Verfahren für die biochemische Identifizierung und Speziesdifferenzierung thermophiler *Campylobacter* spp. angewandt:

Gram-Färbung

Kolonien der Reinkultur wurden vom MHB-Agar auf einen Objektträger mit einer Platinöse übertragen und nach Gram gefärbt. Bei der Betrachtung im Lichtmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) zeigten sich Gram-negative, kommaförmige bis korkenzieherartige Stäbchen, z.T. auch mit kokkoider Form. Dabei haben die Stäbchen eine Größe von ca. 0,3-0,4 µm Breite und 0,5-8,0 µm Länge.

Katalase-Aktivität

Das Enzym Katalase katalysiert die Bildung von Sauerstoff und Wasser aus Wasserstoffperoxid.

Eine Öse Koloniematerial der Reinkultur vom MHB-Agar wurde auf einen Objektträger gegeben und mit ca. 10 µl 3%iger Wasserstoffperoxidlösung betropft. Bei Vorhandensein von Katalase kam es zur Bläschenbildung, was als

positive Reaktion gewertet wurde. Als Positivkontrolle wurde der Referenzstamm *C. jejuni* (DSMZ 4688) verwendet.

Test auf Beweglichkeit

Mit einer Einmalöse wurde Koloniematerial vom bebrüteten Mueller-Hinton-Blutagar auf einem Objektträger in 10 µl isotonischer NaCl-Lösung suspendiert und anschließend über den hängenden Tropfen im Phasenkontrastmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung auf Beweglichkeit untersucht. Anstatt des Koloniematerials konnten auch 10 µl aus der beimpften Brucella-Bouillon verwendet werden. *Campylobacter* spp. zeigten eine schnelle, z.T. spiralig-drehende Beweglichkeit.

Nalidixinsäure- und Cephalothin-Sensibilität

Von der beimpften Brucella-Bouillon wurden ca. 0,1 ml auf MHB-Agar ausgespatelt. Anschließend wurde der Nährboden mit jeweils einem 30 µg Nalidixin- und Cephalothinblättchen bestückt. Nach 24 Stunden mikroaerober Bebrütung bei 42°C erfolgte die Auswertung. *Campylobacter* spp. wurden als sensibel beurteilt, wenn sich aufgrund fehlenden Bakterienwachstums sichtbare Hemmhöfe bildeten. Hatten sich keine Hemmhöfe um die Antibiotika-Testblättchen gebildet, wurden die Keime als resistent gewertet.

Wachstum bei 25°C und 43°C

Zum Testen des Wachstumsverhaltens von thermophilen *Campylobacter* spp. wurde jeweils eine Öse von beimpfter Brucella-Bouillon auf MHB-Agar ausgestrichen und für 48 Stunden bei 25°C und 43°C in Anaerobiertöpfen mit Hilfe von Gasentwicklern (Campy Pak PlusTM, Oxoid) mikroaerob bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach Tab. 20. Als Negativkontrolle (25°C) wurde der Referenzstamm *C. jejuni* (DSMZ 4688) mit bebrütet.

Hippurathydrolyse- Test

C. jejuni ist im Gegensatz zu allen anderen *Campylobacter* spp. in der Lage, Hippursäure zu spalten. Hippursäure wird dabei durch das Enzym Hippurikase in Benzoessäure und Glycin gespalten. In Verbindung mit dem gelben Indikator

Ninhydrin wird das Spaltprodukt Glycin durch einen Farbumschlag nach dunkelviolett nachgewiesen.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt: 1%ige Na-Hippuratlösung wurde mit Aqua dest. hergestellt. Von dieser Lösung wurden 0,4 ml in sterile Reagenzröhrchen mit Meßpipetten überführt und mit einer Öse Koloniematerial der Reinkultur beimpft. Die Röhrchen wurden anschließend für 2 Stunden bei 37°C in ein Wasserbad gestellt. Zum Nachweis der Farbreaktion wurden 0,2 ml Ninhydrin-Reagenz pro Reagenzröhrchen mit Meßpipetten dazugegeben und diese für weitere 10 Minuten in das Wasserbad gestellt. Der Test verlief positiv bei einem Farbumschlag nach dunkelviolett. Blieb die Lösung klar oder gelblich wurde sie als negativ gewertet. Zusätzlich wurden bei dem Test die Referenzstämme *C. jejuni* (DSMZ 4688) als Positiv- und *C. coli* (DSMZ 4689) als Negativkontrolle mit angesetzt.

Indoxyl-Acetat-Hydrolyse-Test

Herstellung der Testblättchen ist in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Die Blättchen wurden mit einer sterilen Pipette fixiert und Koloniematerial der Reinkultur auf ihnen verrieben. Anschließend wurde ein Tropfen Aqua dest. hinzugefügt. Nach 10-30 Minuten erfolgte eine Beurteilung der Farbreaktion. Bei einer Verfärbung nach dunkelblau war der Test positiv. Blieb das Blättchen dagegen farblos war das Ergebnis negativ. Als Positivkontrolle dienten die Referenzstämme *C. jejuni* (DSMZ 4688) und *C. coli* (DSMZ 4689), als Negativkontrolle der Referenzstamm *C. lari* (DSMZ 11375).

3.2.4 Stammsammlung der Isolate

Zunächst wurden der beimpften Brucella-Bouillon 0,5 ml steriles Glycerin (10% v/v) als Kryoprotektivum hinzugefügt. Jeweils 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde in Schraubkappenröhrchen pipettiert, die zu einem Viertel mit Glasperlen gefüllt waren. Insgesamt wurden 639 ausgesuchte Isolate in doppelter Ausführung bei -80°C in 2 Tiefkühlschränken (1 Schrank mit Duplikaten) gelagert.

Tab. 20: Kulturelle und biochemische Differenzierung der Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* des Genus *Campylobacter* (modifiziert nach VANDAMME und GOOSSENS, 1992)

Spezies	Hydrolyse		Katalase	Wachstum		Gram	Empfindlichkeit	
	Hippurat	Indoxyl-Acetat		25°C	43°C		Nalidixin-säure	Cephalothin
<i>C. jejuni</i>								
spp. <i>jejuni</i>	+	+	+	-	+	n	s	r
<i>C. jejuni</i>								
spp. <i>doley</i>	+/-	+	+/-	-	-	n	s	s
<i>C. coli</i>	-	+	+	-	+	n	s	r
<i>C. lari</i>	-	-	+	-	+	n	r	r

C. = *Campylobacter*; += positive Reaktion; -= negative Reaktion; +/- = variable Reaktion; n = Gram-negativ; s = sensibel; r = resistent

3.2.5 Referenzstämme

Für die Kontrolle der verwendeten Nährmedien und biochemischen Reaktionen wurden *C. jejuni*-, *C. coli*- und *C. lari*- Stämme eingesetzt. Sie stammten alle aus der DSMZ-Sammlung (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig. Eine Übersicht zeigt die Tab. 21.

Tab. 21: Für Kontrolluntersuchungen verwendete Referenzstämme

Spezies	Stamm-bezeichnung	Herkunft	Bezeichnungen anderer Stammsammlungen
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	DSM 4688	DSMZ	=ATCC 33560, CCUG 6823, CIP 702, NCTC 11351
<i>C. coli</i>	DSM 4689	DSMZ	=ATCC 33559, CCUG 11283, CIP 7080, LMG 6440, NCTC 11366
<i>C. lari</i>	DSM 11375	DSMZ	=ATCC 35221, CCUG 10773, LMG 7605, NCTC 11352

ATCC: American Type Culture Collection, MD, Rockville, USA

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

CCUG: Culture Collection, University of Göteborg, Göteborg, Schweden

CIP: Institut Pasteur, CIP-Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France

NCTC: National Collection of Type Cultures, PHLS Central Public Health Laboratory, L., UK

LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, Belgium

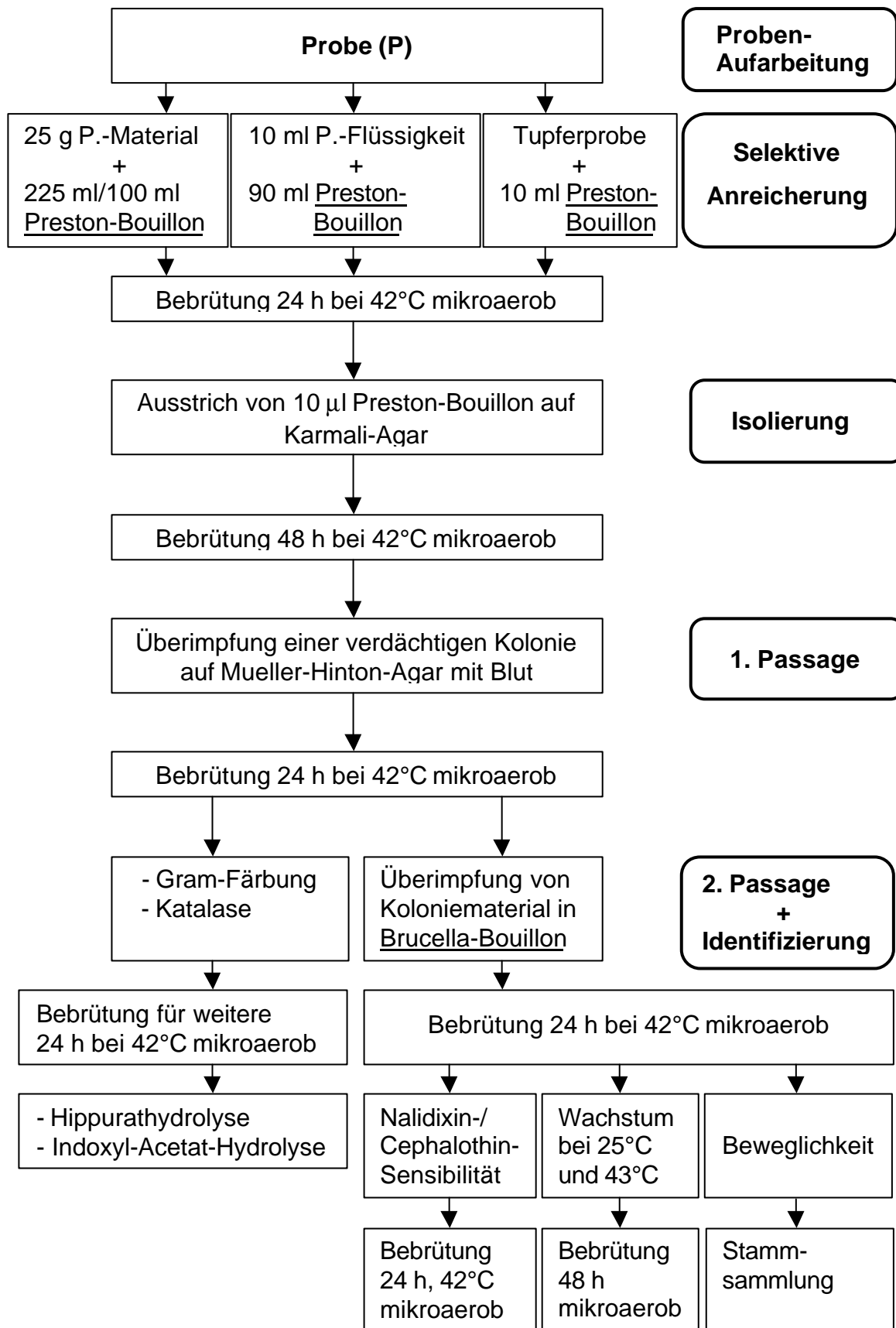


Abb. 5: Untersuchungsgang zur Isolierung und Identifizierung von thermophilen *Campylobacter* spp.

Tab. 22: Probenahme vor, während und nach der Masthähnchenschlachtung

Monat	Anzahl der entnommenen Proben (n)																					
	Dez 01		Jan 02		Feb 02		Mrz 02		Apr 02		Mai 02		Jun 02		Juli 02		Aug 02					
Mastbetrieb A, B, C	B		A		B		C		B		A		B		A		A		B			
Herde (2 Herden/Schlachtttag)	3	4	2	4	1	4	5	1	4	1	15	11	3	2	13	12	5	8	4	3	4	1
vor Schlachtung																						
Transportkistenwaschwasser (100ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Transportkisten vor R/D (Tupfer)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
Transportkisten nach R/D (Tupfer)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
Betäubungsbad (100ml)	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Brühwasser (100ml)	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Wasser aus Leber-Magen-Wanne (100ml)	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-
Schlachtung																						
Tupferabstrich v. Tierkörper nach Brühen	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
Blinddärme	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber, Magen, Herz (à 250g)	3	3	3	3	3	3	-	3	-	-	-	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Halshaut nach Luftkühlung (25g)	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5
Endprodukt (Tierkörper)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
nach Schlachtung																						
Transportkistenwaschwasser (100ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Betäubungsbad (100ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Brühwasser (100ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Wasser aus Leber-Magen-Wanne (100ml)	1	1	1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

-= keine Probenahme; R/D= Reinigung/Desinfektion

3.2.6 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Verfolgung herdenspezifischer Stämme wurden insgesamt 237 ausgewählte *Campylobacter*-Isolate mittels PFGE genotypisch feindifferenziert. Dafür wurden Isolate von Herden verwendet, welche z.T. in direkt aufeinanderfolgenden Mastperioden beprobt wurden und deren entnommenen Proben aus Mast und Schlachtung nahezu zu 100% *Campylobacter*-positiv waren. Als Untersuchungseinheit wurden jeweils die Proben von 2 Herden eines Betriebes aus der Mast sowie die Proben dieser Herden aus der Schlachtung betrachtet. Beide Herden wurden in direkter Folge geschlachtet, wobei die erste beprobte Herde immer die erste des jeweiligen Schlachttages war.

Es wurden 45 Isolate aus der Mast und 192 Isolate aus der Schlachtung für Verfolgsuntersuchungen feintypisiert. Die Stämme waren bei Beprobungen von 2 Herden des Mastbetriebes A, sowie von 4 Herden des Mastbetriebes B gewonnen worden. Die Isolate des Betriebes B stammten aus 2 direkt aufeinanderfolgenden Mastperioden.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde im *Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin*, im Fachgebiet Mikrobiologie und Hygiene durchgeführt. Dabei wurde eine Modifizierung der von CAMPYNET (<http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html>) empfohlenen Methode angewendet (BECKMANN et al., 2002) (Tab. 23, S. 90).

Alle 237 Isolate wurden unter der Verwendung des Restriktionsenzym *SmaI* typisiert. Von 103 ausgewählten Typen dieser Isolate wurden darüber hinaus zusätzlich DNA-Fingerprintmuster mit dem Restriktionsenzym *KpnI* erstellt und ausgewertet. Anhand dieses unabhängigen zweiten Enzyms sollten die Ergebnisse der Clusterbildung abgesichert werden.

3.2.6.1 Vorbereitung und Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese Aktivierung der Isolate

Für die Aktivierung der tiefgefrorenen Stämme wurden pro Isolat 2 bis 3 Glasperlen mit einer sterilen Pinzette aus den Schraubkappenröhrchen entnommen und mit einer Platinöse auf MHB-Agar ausgerollt. Die Platten wurden anschließend in Anaerobiertöpfen mit Hilfe von Gasentwicklern (Campy Pak PlusTM, Oxoid) mikroaerob für 48 Stunden bei 42°C inkubiert.

Isolierung und Reinigung der chromosomalen DNA

Von den bebrüteten MHB-Platten wurden *Campylobacter*-Kolonien erneut auf MHB-Agar überimpft und für weitere 24 Stunden bei 42°C mikroaerob inkubiert. Zum Abschwemmen des Keimes wurden 2 ml Pett IV-Puffer auf jede Platte pipettiert und anschließend die Kolonien mit einem Spatel von der Platte jeweils in sterile Eppendorf-Röhrchen überführt. Die mit Keimsuspension gefüllten Zentrifugenröhrchen wurden zum Schutz der Bakterien in einer Kühlbox bei 4°C gelagert. Es folgte eine Homogenisierung der Keimsuspension mit einem Rüttler. Zur Bestimmung der Keimzahl (Messung der optischen Dichte) wurde ein Densimat verwendet. Dafür wurden ca. 1,5 ml Pett IV-Puffer in das Glasröhrchen des Densimates vorgelegt. Von der Keimsuspension wurde dann soviel dazu pipettiert bis die Zelldichte auf 6,0-6,5 McFarland ($\cong 1 \times 10^9$ Zellen/ml) eingestellt war. Aus den eingestellten Suspensionen wurden jeweils 500 μ l entnommen, in sterile Zentrifugenröhrchen pipettiert und in einer Kühlbox gelagert.

Herstellung der Agarose-Blöckchen

2%ige InCert[®]-Agarose wurde in Aqua bidest. gelöst, aufgekocht und anschließend bei 56°C im Wasserbad flüssig gehalten. Die InCert[®]-Agarose besaß einen besonders niedrigen Schmelzpunkt (low melting point Agarose) und ermöglichte dadurch das Einbetten thermolabiler Elemente, wie z.B. lebender Zellen. Es wurde darauf geachtet, daß sich nach dem Kochen keine Schlieren gebildet hatten und die Flüssigkeit klar blieb. Für das Gießen der Blöckchen wurden 500 μ l der flüssigen 2 %igen InCert[®]-Agarose in die 500 μ l Keimsuspension (1:1) pipettiert und gemischt. Diese Mischung wurde ohne Luftbläschen in Blöckchenformen pipettiert. Von jeder Probe wurden 5 Blöckchen hergestellt. Zum Erstarren der Agarose erfolgte eine Lagerung der abgedeckten Blöckchenformen für 40 Minuten bei 4°C im Kühlschrank. Das Einbetten ganzer Zellen in die Agarose in Form von Blöckchen verhinderte ein Scheren oder Brechen der *Campylobacter*-DNA. Die Agarose schützte und bewahrte einerseits die langen DNA-Moleküle und andererseits war sie für Puffer und Enzyme permeabel. Alle weiteren Lyse- und Verdauungsschritte wurden mit diesen Blöckchen durchgeführt.

Freilegen der *Campylobacter*-DNA mit Hilfe des ESP-Puffers

Für die Herstellung vom Lysispuffer wurde zunächst 1%iges N-Laurylsarcosin in 0,5 molarem EDTA-Puffer gelöst und anschließend 0,1%ige Proteinase K (1 mg/ml) dazu gegeben. Für jede Probe wurde jeweils 3 ml dieses ESP-Puffers in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Tube) pipettiert und 5 Blöckchen dazu gegeben. Die Tubes wurden anschließend bei 56°C für 48 Stunden im Wasserbad inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur von 56°C nicht überschritten wurde, da ansonsten die Proteinase K-Aktivität eingeschränkt worden wäre. Der Lysispuffer diente zum Verdau der Zellmembran, die Proteinase K zur proteolytischen Spaltung von Proteinen des Chromatins, um eine reine *Campylobacter*-DNA zu erhalten. Nach der Lyse wurde der ESP-Puffer dekantiert und die Blöckchen 4x für jeweils 30 Minuten in 20 ml TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) bei 37°C gewaschen, um Lysispuffer und Proteinase K zu inaktivieren und mitsamt anderen Verdau-Resten bzw. Spaltprodukten zu entfernen. Dieser Vorgang wurde wie folgt durchgeführt: 20 ml TE-Puffer (pH 8) wurden jeweils zu den Blöckchen in die Tubes gegeben. Anschließend wurden diese im Wasserbad bei 37°C unter gleichmäßigem Schütteln bewegt. Nach 30 Minuten wurde der TE-Puffer abgegossen und der Waschvorgang 3x wiederholt. Die so behandelten Blöckchen konnten nun entweder in TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt oder sofort für den Restriktionsverdau eingesetzt werden.

Restriktionsverdau

Direkt nach dem Waschen wurden die Blöckchen aus den Tubes entnommen und mit einer Skalpellklinge passend für die Geltaschen in 2 gleich große Hälften geteilt. Die halben Blöckchen wurden dann einzeln in sterile Eppendorftubes überführt. Für den anschließenden Verdau wurde eine Restriktionslösung verwendet. Dazu erfolgte zunächst die Herstellung eines Restriktionsmixes, bestehend aus RNA-freiem Aqua bidest., 10 fach-konzentriertem Puffer 4 (*Sma*I), bzw. Puffer 1 (*Kpn*I) und 100 fach-konzentriertem Bovinen Serumalbumin (BSA). Zum Restriktionsmix wurden je nach Verdau 20 units *Sma*I oder *Kpn*I als Restriktionsendonukleasen dazugegeben und jeweils 100 µl dieses Restriktionsgemisches in die Eppendorftubes auf die Blöckchen pipettiert. Es folgte eine 18-stündige Inkubation im Thermostat bei 25°C, bei der die DNA des jeweiligen Isolates mit *Sma*I geschnitten wurde. Bei Isolaten, deren DNA mit

KpnI geschnitten wurde, erfolgte eine 18-stündige Inkubation mit einer Temperatur von 37°C. Anschließend wurde die Enzymreaktion gestoppt durch Abpipettieren des Restriktionsmixes und Hinzugeben einer Stopplösung. Dafür wurden 200 µl 0,5xTBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer zusammen mit 0,005% Bromphenolblau auf die Blöckchen gegeben. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion wurde die Stopplösung abpipettiert. Die Blöckchen waren somit fertig zum Bestücken des Gels.

Gießen des Gels

Zur Herstellung des Gels wurde zunächst 1%ige SeaKem-Agarose in 0,5x TBE-Puffer suspendiert. Danach wurde die Agarose-Suspension vorsichtig aufgekocht, bis sie flüssig, klar (ohne Schlieren) und blasenfrei war und anschließend bei 56°C in ein Wasserbad gestellt. Die Agarose-Lösung wurde dann unter Vermeidung von Luftblasen in die Kammer gegossen. Im Anschluß wurde das Gel 20 Minuten bei Raumtemperatur und weitere 20 Minuten im Kühlschrank bei 4°C bis zum Erstarren gelagert. Danach konnte der Kamm vorsichtig entfernt werden.

Beladen des Gels

Es wurden immer pro Gel 20 Spuren belegt. 16 Spuren konnten mit Proben und 4 mit Markern belegt werden. Dabei wurden jeweils in Spur 1, 10 und 20 der *C. coli*-Stamm CNET 068 als Normalisierungs-Standard, sowie in Spur 11 ein λ -Leiter (Lambda Ladder) zur Größenbestimmung (Kilobasen) der Banden mitgeführt.

Für die Beladung des Gels wurden die Blöckchen in den Eppendorftubes in einen Heizblock gestellt und 10 Minuten bei 68°C geschmolzen. Von jedem geschmolzenen Blöckchen wurden anschließend 18-20 µl in die Geltaschen pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen bildeten. Waren alle Spuren belegt, wurde das Gel in die PFGE-Kammer eingesetzt, in der 2 Liter 0,5xTBE als Laufpuffer eingefüllt waren. Die Kammer wurde konstant auf 10 °C temperiert.

Pulsfeld-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente geschnitten mit *Sma*I

Zunächst wurden die Gele im Laufpuffer 10 Minuten äquilibriert und danach die DNA-Fragmente mit Hilfe einer CHEF-DR[®]-III Elektrophoreseeinheit 22,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde die Pulsfeld-Gelelektrophorese mit linear ansteigenden Pulszeiten von 0,5 bis 40 Sekunden in einem Feld von 6 Volt/cm und einem Winkel von 120° durchgeführt. Während des Versuches lag die Temperatur in der Kammer konstant bei 10°C.

DNA-Fragmenten geschnitten mit *Kpn*I

Die Gele wurden 10 Minuten im Laufpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe der CHEF-DR[®]-III Elektrophoreseeinheit 23 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde die Pulsfeld-Gelelektrophorese mit linear ansteigenden Pulszeiten von 4 bis 20 Sekunden in einem Feld von 6 Volt/cm und einem Winkel von 120° durchgeführt. Während des Versuches lag die Temperatur in der Kammer konstant bei 10°C.

Färbung des Gels und Ergebnis- Dokumentation

Nachdem der Lauf des Gels beendet war, wurde es zur Anfärbung der DNA für 8-10 Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend für eine weitere Stunde in Aqua dest. gewässert.

Zur Dokumentation des Ergebnisses wurde das Gel in eine Dunkelkammer gelegt. Die Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel mit einer CCD-Kamera fotografiert. Anschließend wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Dokumentationssoftware in ein für die Auswertungssoftware lesbares Dateiformat umgewandelt (TIFF-Tagged Image File-Format, zweidimensional, 256 Grautöne).

Tab. 23: Eingesetzte Parameter der Pulsfeld-Gelelektrophorese für Isolate geschnitten mit *Sma*I und *Kpn*I (modifiziert nach BECKMANN et al., 2002)

Parameter	PFGE-Methoden mit den Restriktionsenzymen	
	<i>Sma</i> I	<i>Kpn</i> I
Wachstum der Stämme	24 h auf Müller-Hinton-Agar mit Blut bei 42°C	24 h auf Müller-Hinton-Agar mit Blut bei 42°C
Abschwemmpuffer	Pett IV	Pett IV
Zelldichte in 1 ml Blöckchen	ca. 1×10^9	ca. 1×10^9
Blöckchenherstellung	500 µl Zellsuspension in 500 µl 2%ige Agarose	500 µl Zellsuspension in 500 µl 2%ige Agarose
Lyse der Bakterien	48 h in ESP-Puffer, 56°C	48 h in ESP-Puffer, 56°C
Restriktionsverdau der genomischen DNA	18 h bei 25°C	18 h bei 37°C
Gel	1% ige SeaKem-Agarose	1% ige SeaKem-Agarose
Laufpuffer	0,5xTBE-Puffer	0,5xTBE-Puffer
Anzahl der zu belegenden Spuren	20	20
Standarts	normalisation standard, Lambda Ladder	normalisation standard, Lambda Ladder
Spurbelegung der Standards	normalisation standard: Spur 1, 10 und 20 Lambda Ladder: Spur 11	normalisation standard: Spur 1, 10 und 20 Lambda Ladder: Spur 11
Pulszeit	0,5 - 40 sec	4 - 20 sec
Dauer	22,5 h	23 h
Spannung	6 V/cm	6 V/cm
Winkel	120°	120°
Temperatur	10°C	10°C

3.2.6.2 Auswertung der PFGE-Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte computerunterstützt mit der Software GelComparII™ Version 3.0. Zunächst wurde das Gelbild als Negativ abgespeichert (Invertieren). Die Banden erschienen dadurch dunkel auf hellem Hintergrund. Jeder Spur wurde Genus, Spezies und Stammnummer zugeordnet. Die Bearbeitung der Spuren erfolgte in drei Abschnitten: Konvertierung, Normalisierung und Analyse. Die gewählten Parameter für die Bearbeitung sind in der Anhangstab. 3 dargestellt.

Konvertierung

Der zu untersuchende Bereich des Gels wurde mit einem flexiblen Rahmen festgelegt. Innerhalb dieses Bereiches befanden sich alle sichtbaren Banden. Auswertbare *Campylobacter*-Stämme sowie die Marker wurden als Spuren auf dem Gel definiert und ihre Laufstrecke densitometrisch erfaßt. Der Kontrast von den Banden zum Hintergrund wurde optimiert, so daß auch schwache Banden deutlich sichtbar erschienen. Die einzelnen Laufstrecken wurden in densitometrischen Kurven erfaßt und dunkel erscheinende Staubpartikel, kleine Luftbläschen etc. mit Filtern aus dem Hintergrund entfernt.

Normalisierung

Als nächster Schritt erfolgte eine Entzerrung des Geles. Diese war notwendig, um eine Angleichung verzerrter, schiefer und verschieden weit gelaufener Banden zu erreichen. Außerdem konnten smiling-Effekte ausgeglichen werden. Sie entstanden dann, wenn die inneren Bahnen auf dem Gel schneller als die äußeren liefen. Ziel der Normalisierung war es, die einzelnen Laufspuren so zu optimieren, daß sie untereinander vergleichbar wurden. Dafür wurde aus allen Gelbildern ein optimal gelaufener Marker (CNET 068) ausgewählt. Seine 13 gleichmäßig verteilte Banden im Bereich von 10 kb bis 500 kb wurden anschließend als Standard-Referenz-System definiert. Dieses wurde für alle Gele zur Normalisierung verwendet, wobei die jeweiligen Marker (CNET 068) der äußeren Spuren (Spur 1 und 20) sowie mittleren Spuren (Spur 10) mit dem Standard-Referenz-System über Referenzlinien in Beziehung gesetzt wurden und gleichzeitig eine Ausrichtung aller dazwischen liegenden Spuren erfolgte.

Dadurch konnten die DNA-Fragmentmuster aller Gele miteinander verglichen werden.

Nach Angleichung der DNA-Fragmentmuster an das Standard-Referenz-System wurden alle erkennbaren Banden einzeln manuell markiert und die fertigen Spuren zur weiteren Auswertung in einer Datenbank gespeichert.

Cluster-Analyse

Zur Feststellung von Verwandtschaftsgraden der untersuchten Stämme wurde die Cluster-Analyse durchgeführt. Dafür wurde ebenfalls das Computerprogramm GelComparII™ Version 3.0. verwendet. Die Software konnte Ähnlichkeiten zwischen den DNA-Fragmentmustern der einzelnen Stämme über Ähnlichkeitskoeffizienten bestimmen. Dabei wurde die Übereinstimmung von Bandenmustern charakterisiert, indem die Anzahl gleicher Banden in Beziehung zur Gesamtbandenzahl gesetzt wurde. Zusätzlich wurde auch die Lage jeder individuellen Bande zu Vergleichsbanden mit einbezogen. Die Abstände wurden über die Auswertungssoftware berechnet. Aus der Summe der Abstandsdifferenzen wurde dann ein Ähnlichkeitsfaktor zwischen Paaren von Bandenmustern berechnet. Die daraus resultierenden Ähnlichkeitskoeffizienten konnten auch als Verwandtschaftsgrade unter den Isolaten interpretiert werden.

Dice-Koeffizient

Zum Vergleich der DNA-Fragmentmuster wurde mittels des Dice-Koeffizienten die Positionstoleranz bei 1,0 % und die Optimierung bei 0,5% festgelegt. Die Positionstoleranz (in prozentuaalem Bezug zur Gesamtlänge der Spuren) begrenzte für den paarweisen Vergleich die maximal erlaubte Distanz zwischen Positionen zweier Banden auf verschiedenen DNA-Fragmentmustern. Innerhalb dieses festgelegten Bereiches wurden die Banden als übereinstimmend gewertet. Die Optimierung setzte fest, in welchem Rahmen das Computerprogramm ganze Bandenmuster als übereinstimmend werten durfte.

UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages)

Für die Berechnung der Verwandtschaftsgrade wurde der UPGMA-Cluster Algorithmus ausgewählt. Er verwendete arithmetische Mittelwerte bei seiner Berechnung zur hierarchischen Gruppenbildung (Cluster). Alle Versuchsergebnisse wurden gleich gewichtet (unweighted). Ein Stamm wurde einem Cluster zugeordnet, wenn die durchschnittliche Ähnlichkeit mit diesem größer war als die Ähnlichkeit mit einem anderen Cluster. Zunächst wurden die Ähnlichkeitskoeffizienten aus Vergleichen von Bandenmustern aller Isolate untereinander in einer Similaritäts-Matrix erstellt. Die gesamte Laufstrecke der einzelnen Spuren und damit sämtliche aufgetretene Einzelbanden wurden durch eine Gesamtprofilanalyse erfaßt. Dann wurden die am besten übereinstimmenden Bandenmuster zweier Isolate (pair group) mit dem größten Ähnlichkeitskoeffizienten als Cluster zusammengefaßt. Dieses Cluster wurde als einzelnes Objekt behandelt, wobei der Mittelwert für weitere Vergleichsuntersuchungen genommen wurde. Bei der weiteren Berechnung wurden das nächste Paar mit dem größten Ähnlichkeitskoeffizienten zu einem Cluster zusammengefaßt. Eine Wiederholung dieser Vorgänge wurde so lange durchgeführt, bis das letzte Cluster mit kleinsten Ähnlichkeitskoeffizienten (mit dem geringsten Verwandtschaftsgrad) berechnet worden war. Eine Übersicht zeigt die Abbildung 6.

Ähnlichkeitskoeffizienten von Bandenmustern der Stämme a, b, c, d in der Similaritäts-Matrix (S.-M.)

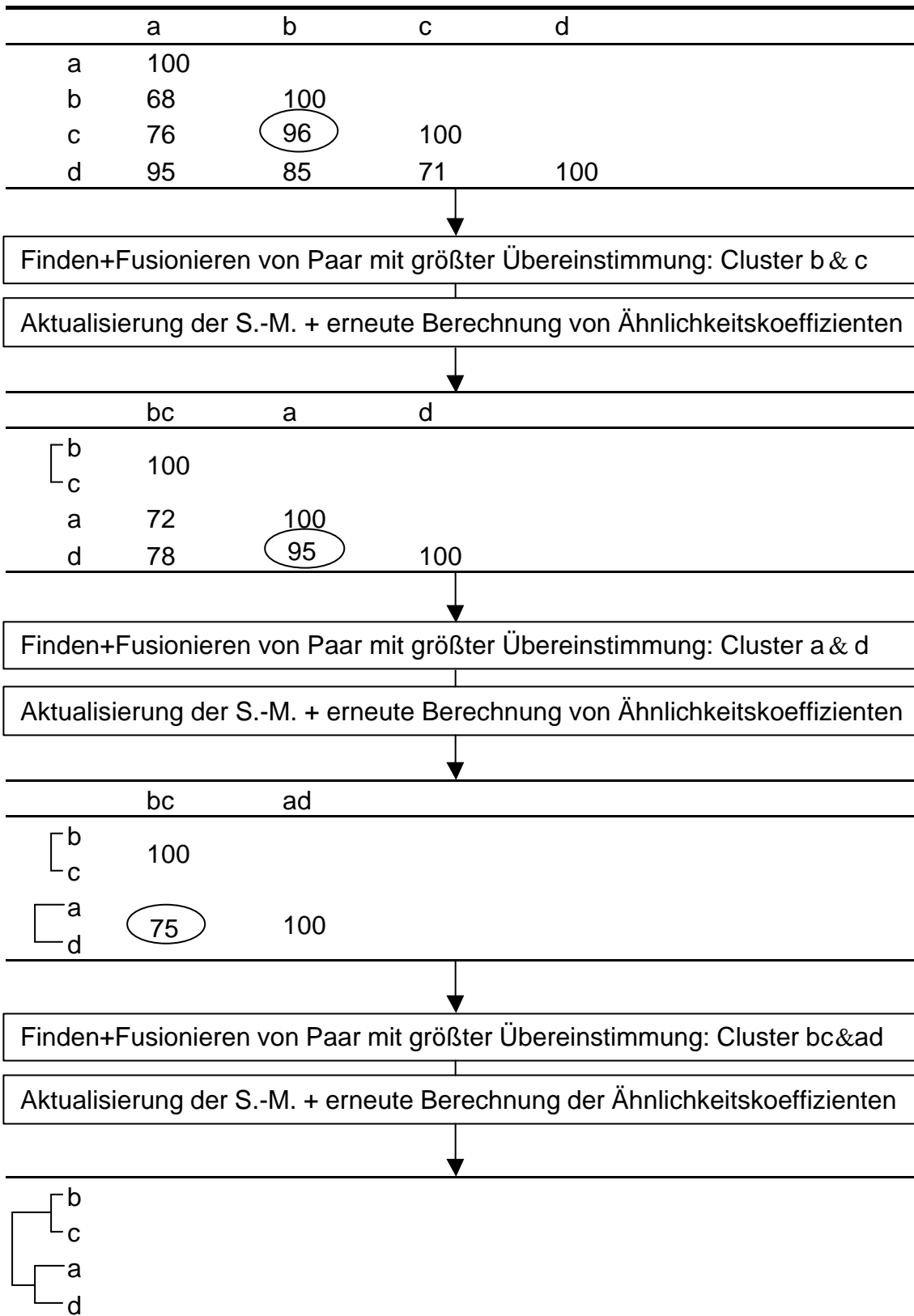


Abb. 6: Cluster-Analyse mit UPGMA (z.B. mit den Stämmen a, b, c, d)

3.2.6.3 Darstellung und Vergleich der PFGE-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Ähnlichkeitsberechnungen wurden graphisch anhand eines Dendrogrammes dargestellt. Im Dendrogramm wurden die Bandenmuster der Isolate zu Clustern zusammengestellt. Ähnlichkeitsgrade wurden durch die Höhe der vertikalen Verbindungslinie zwischen zwei Gruppen oder Stämmen ausgedrückt und konnten auf einer Skala in Prozent abgelesen werden.

Die Grenze der Ähnlichkeit (Cut off) wurde bei $r = 87\%$ (*C. jejuni*-Stämme) bzw. bei $r = 83\%$ (*C. coli*-Stämme) festgelegt. Stämme, die eine Ähnlichkeit von über 86% bzw. 82% aufwiesen, wurden in gemeinsamen Clustern zusammengefaßt.

Stammspezifischer Vergleich

Die zuvor biochemisch differenzierten Stämme wurden im Dendrogramm nach ihrer Spezies zusammengestellt, d.h. es wurden jeweils nur Stämme einer Spezies miteinander verglichen. Dafür wurde die gesamte elektrophoretische Laufstrecke für die Untersuchung mit einbezogen, um Aussagen bezüglich Herkunft (Herdenspezifität oder Fremdisolat) der verschiedenen Isolate zu treffen. Stämme mit einer Ähnlichkeit von $r \geq 87\%$ bzw. $r \geq 83\%$ wurden als identisch angesehen.

3.2.6.4 Bestätigung der PFGE-Ergebnisse

Von allen 237 ausgewählten *Campylobacter*-Stämmen wurde unter Verwendung des Restriktionsenzym *Sma*I ein DNA-Fingerprintmuster erstellt. Für die Bestätigung der Ergebnisse wurden von den 237 Stämmen zusätzlich 103 Stämme in einer zweiten Vergleichsuntersuchung typisiert. Die genomische DNA wurde dabei mit dem Restriktionsenzym *Kpn*I verdaut und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Mit dieser zweiten Differenzierungsmethode sollten anhand eines unabhängigen zweiten Enzyms die Ergebnisse der Clusterbildung abgesichert werden.