

---

## 4 Eigene Untersuchungen (Teil 2): Versuche zur Reisolierung von *Campylobacter jejuni* aus experimentell mit niedrigen Keimzahlen inokulierter Milch

---

### 4.1 Material und Methodik

#### 4.1.1 Untersuchungsmaterial und Probennahme

Für die Untersuchungen, die den Tabellen und Ausführungen in Abschnitt 4.3 (Ergebnisse) zugrunde liegen, wurden insgesamt 297 Milchproben verwendet:

- 129 Rohmilchplanproben (Bestandsproben),
- 126 Proben aus 27 verschiedenen UHT-Milchen mit 0,3%, 1,5% und 3,5% Fettgehalt, abgefüllt in Glasflaschen oder Tetra Pak,
- 42 Proben aus 12 verschiedenen pasteurisierten Milchen mit 1,5% und 3,5% Fettgehalt, abgefüllt in Tetra Pak.

Die Rohmilchplanproben kamen meist auf dem Postweg von den verschiedenen Landratsämtern und waren dann maximal 24 Stunden alt. In einigen Fällen wurden Proben auch direkt nach der Entnahme zum LUA gebracht. Diese Proben waren nicht älter als 3 Stunden.

Die UHT- und pasteurisierten Milchen stammten aus dem Einzelhandel. Sie wurden von Lebensmittelüberwachungsbeamten zur bakteriologischen und chemischen Untersuchung am LUA abgegeben.

Alle Proben wurden mit einem humanen *Campylobacter-jejuni*-Referenzstamm aus dem LUA in Erlangen beimpft und inkubiert. Unter dem Mikroskop präsentierte sich dieser Referenzstamm ähnlich wie die in Abb. 2 (Seite 13) abgebildete typische *Campylobacter-jejuni*-Kultur.

Um während der mehrmonatigen Untersuchungen immer auf diesselbe Ausgangspassage dieses Referenzstammes zurückgreifen zu können, wurde der Keim auf zahlreichen Blutplatten angezüchtet und in einigen Portionen lyophilisiert. Derart behandelt ist *Campylobacter jejuni/Campylobacter coli* monatelang im Kühlschrank lagerungsfähig.

Zur Durchführung der Untersuchungen wurde der Inhalt eines Gläschens Lyophilisat zunächst in Brucella Bouillon gelöst, 24 Stunden mikroaerophil bei 37°C im Anaerobtopf angereichert und anschließend jeweils 0,1 ml der Anreicherungsflüssigkeit auf Blutagarplatten ausgestrichen. Durch Bebrütung im bevorzugten Milieu bei 42°C über einen Zeitraum von 48 Stunden läßt sich der Erreger dann wieder anzüchten.

Mit der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Verdünnungsflüssigkeit wurden die für die Versuche erforderlichen Keimzahlen von *Campylobacter jejuni* eingestellt.

#### 4.1.2 Nährböden und Reagenzien

Wie in Abschnitt 3.1.2 .

---

## 4.2 Reisolierung von *Campylobacter jejuni* nach Inokulation in verschiedene Milchen

### 4.2.1 Koloniezahlbestimmung von *Campylobacter jejuni* in Reinkultur

*Campylobacter jejuni* wurde in vielen Portionen lyophilisiert, um immer wieder auf die gleiche Ausgangspassage zurückgreifen zu können. Das Lyophilisat wurde mit Brucella-Bouillon aufgeschwemmt und 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Aufgrund der für die Lyophilisierung verwendeten Magermilch kam es bereits in der Brucella-Bouillon zu einer schwachen Trübung. Der Keimgehalt der einzelnen Lyophilisat-Portionen schwankte beträchtlich. Deshalb konnten die obengenannten Keimzahlen nicht von den McFarland-Standards ausgehend eingestellt werden, sondern ausgehend von 1 ml Brucella-Bouillon wurde eine dekadische Verdünnungsreihe aus gepuffertem Peptonwasser hergestellt. Die Keimzahl von *Campylobacter jejuni* bleibt in diesem Medium bei 4°C tagelang konstant. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 3 x 0,1 ml auf Skirrow-Agar ausgespatelt und 48 Stunden bei 42°C bebrütet. Aus diesen drei Keimzahlen wurde, wenn möglich, das arithmetische Mittel gebildet. Durch weiteres Verdünnen einer geeigneten Verdünnungsstufe wurde die erforderliche Keimzahl eingestellt. Bei 4°C bleibt die eingestellte Keimzahl einige Tage konstant. Aus diesen Röhrcchen konnten dann die Proben beimpft werden.

Aufgrund von Zählfehlern, Schwärmrasenbildung und technischen Fehlern kam es besonders bei der niedrigsten einzustellenden Keimzahl von ca. 100 KBE/ml zu größeren Abweichungen (Tabelle 36, Tabelle 37 und Tabelle 41).

Das Problem des Wachstums in Form von vielen winzigen Kolonien („vwk“, vgl. Tabelle 29, Seite 68) oder mehr oder weniger ausgeprägten Schwärmrasen findet eine Erklärung in der Beschaffenheit der verwendeten Skirrow-Selektivnährböden und Blutplatten und der aufgetragenen Milch.

Frisch gegossene, sehr feuchte Platten, wie sie vor allem verwendet wurden, unterstützen das Schwärmverhalten des Keimes. Die Kolonien zerfließen auf dem feuchten Nährboden, bzw. 0,1 ml aufgetragenes Untersuchungsmaterial/ Milch bildet einen Feuchtigkeitsfilm auf den Platten und verhindert ein deutliches Erkennen einzelner gewachsener Kolonien.

Wurden ältere Nährböden verwendet oder die Platten nach dem Gießen bei 37°C einige Stunden in einem sterilen Raum getrocknet, anschließend bei 4°C gekühlt und wieder 12 Stunden vor der Beimpfung bei Raumtemperatur von 22°C geschlossen gelagert, so stellt sich das Wachstum von *Campylobacter jejuni* meist in Form von vielen, durchschnittlich ca. ein bis zwei Millimeter im Durchmesser großen oder winzigen Einzelkolonien dar. Die Ausbildung von Schwärmmrasen wird dadurch stark unterdrückt, aber nicht gänzlich unterbunden.

Allerdings steigt das Risiko einer Fremdkeimbesiedlung oder Verschimmelung der Platten bei dieser Trocknungsprozedur erheblich.

#### 4.2.1.1 Quantitativer Nachweis

Es sollte untersucht werden, wie sich *Campylobacter jejuni* quantitativ nach Inkubation in verschiedene Milchen verhält. Wesentliche Parameter bei dieser, wie auch bei allen folgenden Untersuchungen sind die Bebrütungsdauer und die Bebrütungstemperatur.

Jeweils 10 ml der betreffenden Milch wurde mit steriler Pipette in ein steriles Reagenzglas gefüllt, mit ca.  $10^4$  KBE/ml bzw. 500 KBE/ml und 100 KBE/ml *Campylobacter jejuni* in Reinkultur beimpft, aufgeschüttelt und bei einer bestimmten Temperatur (4°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C bzw. 42°C) aufbewahrt. Nach jeweils 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden 0,1 ml der so behandelten Milch entnommen und mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf Skirrow-Agar ausgespatelt. Dieser wurde dann 48 Stunden bei 42°C mikroaerophil im Anaerobentopf mit Katalysator und Gas Generating Kit für *Campylobacter jejuni* bebrütet.

#### **Anmerkung:**

Die Einstellung sehr niedriger Keimzahlen erwies sich als kritisch und potentiell fehlerbehaftet. Eine ähnliche Problematik tritt auch bei der Auswertung der bewachsenen Nährböden auf. Auf beide Punkte wird im Abschnitt 6.3.3.1, Seite 92, gesondert eingegangen.

#### 4.2.1.2 Kontrollen

Parallel zum Nachweis von *Campylobacter jejuni* nach Inokulation in die betreffende Milch wurden jeweils eine positive und eine negative Kontrolle durchgeführt:

- Zur positiven Kontrolle wurden 0,1 ml der verwendeten Verdünnungsflüssigkeit jeweils auf eine Blut- und eine Skirrow-Agar-Platte ausgespatelt und ebenfalls bei 42°C über einen Zeitraum von 48 Stunden mikroaerophil bebrütet.
- Zur negativen Kontrolle wurden 0,1 ml der unbeimpften Milch jeweils auf eine Blut- und eine Skirrow-Agar-Platte ausgespatelt und ebenfalls bei 42°C über einen Zeitraum von 48 Stunden mikroaerophil bebrütet.

#### 4.2.2 UHT- Milch

Auch die verwendete UHT- Milch wurde auf ihren Keimgehalt hin überprüft. Alle Proben erwiesen sich als keimfrei und waren somit für die folgenden Versuche geeignet.

#### 4.2.3 Pasteurisierte Milch

Pasteurisierte Milch ist nicht steril. Bei den verwendeten Proben lag der festgestellte Gesamtkeimgehalt allerdings unter  $10^4$  KBE/ml, war also gering. Auf den bebrüteten Platten ist zusätzlich zu dem experimentellen Inokulum mit dem Wachstum von Begleitflora zu rechnen.

#### 4.2.4 Rohmilch

Es wurden nur Rohmilchplanproben, keine Mastitisproben und keine sonstigen Verdachtsproben zur Untersuchung herangezogen.

##### 4.2.4.1 Feststellung der vorhandenen Begleitflora

Im Gegensatz zu pasteurisierter oder gar sterilisierter Milch ist der Gesamtkeimgehalt in Rohmilch erheblich. Diese Tatsache machte es erforderlich, zum Versuchszeitpunkt die in der jeweiligen Rohmilchplanprobe enthaltene Begleitflora zu bestimmen.

Dazu wurde eine Öse bzw. 0,1 ml Rohmilch auf selektive Nährböden ausgestrichen oder in selektive Bouillons geimpft und anschließend entsprechend bebrütet. Welche Selektivnährböden bzw. -bouillons zum Nachweis welcher Keime dienen, geht aus Tabelle 27 hervor.

**Tabelle 27 Selektivnährböden und -bouillons zur Bestimmung der Begleitflora**

Selektivnährboden (SN)/ Selektivbouillon (SB) (Hersteller und Nr.)	Nachgewiesener Keim	Bebrütungs- dauer	Bebrütungs- temperatur	Milieu bei der Bebrütung
SN Baird-Parker (Fa. Merck, Nr. 5406)	Staphylokokken	1-2 d	37°C	Aerob
SN Edwards (Fa. OXOID, CM27)	Streptokokken	1-2 d	37°C	Aerob
SN Mc Conkey (Fa. Merck, Nr. 5465)	<i>Escherichia coli</i>	1 d	37°C	Aerob
SN Rogosa (Fa. Merck, Nr. 5413)	Laktobazillen	3-5 d	37°C	Anaerob
SN M17 (Fa. Merck, Nr. 15108)	Milchstreptokokken	5 d	30°C	Aerob
SN YGC (Fa. Merck, Nr. 16000)	Hefen	4 d	25°C	Aerob (Plattengußverfahren)

**Tabelle 27** Selektivnährböden und -bouillons zur Bestimmung der Begleitflora (Fortsetzung)

Selektivnährboden (SN)/ Selektivbouillon (SB) (Hersteller und Nr.)	Nachgewiesener Keim	Bebrütungs- dauer	Bebrütungs- temperatur	Milieu bei der Bebrütung
SN Mossel (Fa. Merck, Nr. 5267)	<i>Bacillus cereus</i>	2 d	30 °C	Aerob
SN BAP (Fa. Merck, Nr. 10886)	Aerobe Sporenbildner	1 d	37 °C	Aerob
SN Skirrow-Agar (Fa. Merck, Nr. 2248)	<i>Campylobacter jejuni</i>	2 d	42 °C	Mikroaerophil
SB Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vassiliadis (Fa. Merck, Nr. 10770)	Salmonellen	1 d	42 °C	Aerob
SN anschließend SS-Agar		1 d	37 °C	Aerob
SB Anreicherungsbouillon nach FDA/DF-FIL (Fa. Merck, Nr. 11951)	Listerien	8 h	20-25 °C	Aerob
SN anschließend Oxford-Listeria-Selektivagarbasis (Fa. Merck, Nr. 7004) mit Oxford-Listeria-Selektiv-Supplement <sup>1</sup> (Fa. Merck, Nr. 7006)		18-24 h	37 °C	Aerob

- 1 Oxford-Listeria-Selektiv-Supplement besteht aus zwei Supplementen:  
 1a) Acriflavin HCl (Sigma Chemical Co, Nr. 8063-24-9),  
 b) Nalidixinsäure (Sigma Chemical Co, Nr. 3374-05-8),  
 2) Cycloheximid (Sigma Chemical Co, Nr. 66-81-9).

Anhand der Untersuchungsergebnisse ließen sich die Rohmilchplanproben folgendermaßen klassifizieren:

- (+) Schwach keimbelastete Rohmilch  
Begleitflora  $\leq 2 \cdot 10^4$  KBE/ml
- (++) Mittelstark keimbelastete Rohmilch  
Begleitflora  $> 2 \cdot 10^4$  KBE/ml, aber  $\leq 10^6$  KBE/ml
- (+++) Stark keimbelastete Rohmilch  
Begleitflora  $> 10^6$  KBE/ml

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde im Landesuntersuchungsamt Nürnberg der Gesamtkeimgehalt der 129 Rohmilchplanproben bestimmt. Es ergab sich die in Tabelle 28 wiedergegebene Verteilung.

**Tabelle 28 Keimbelastung der 129 untersuchten Rohmilchproben<sup>1</sup>**

<b>Keimbelastung:</b>	+	++	+++
<b>Anzahl der Proben:</b>	45	42	42

1 Herrn VD Dr. C. Baumann und Frau VOR I. Unkauf danke ich an dieser Stelle herzlich für die freundliche Überlassung der Untersuchungsergebnisse.

#### 4.2.5 Experimentelle Inokulation von *Campylobacter jejuni* in wärmebehandelte Milch

Die UHT-Milchpackungen wurden unter sterilen Kautelen geöffnet. Mit steriler Pipette wurden 10 ml der betreffenden Milch in ein steriles Reagenzglas gefüllt, mit ca.  $10^4$  KBE/ml, 500 KBE/ml oder 100 KBE/ml beimpft, aufgeschüttelt und bei Temperaturen von 4°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C und 42°C aerob inkubiert (CHRISTOPHER et al., 1982a).

Nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden jeweils 0,1 ml der so behandelten Milch entnommen und mit einem sterilen Drigalski-Spatel auf Skirrow-Agar ausgespatelt. Dieser wurde dann 48 Stunden bei 42 °C mikroaerophil im Anaerobentopf mit Katalysator und Gas Generating Kit für *Campylobacter jejuni* bebrütet.

Nach Inkubation wurden die bewachsenen Platten makroskopisch begutachtet und die gewachsenen *Campylobacter*-Kolonien ausgezählt. Auch hier erschwerte die Fähigkeit des Keimes, Schwärmmrasen verschiedenster Größe zu bilden, die Auswertung erheblich. Deshalb beschränkte sich die Auszählung auf Platten mit nur einzelnen Kolonien.

Die Durchführung der Untersuchung in pasteurisierter Milch erfolgte analog zur Vorgehensweise bei UHT-Milch. Die beimpften Rohmilchplanproben wurden bei 4°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C und 42°C bis zu 24 Stunden lang bebrütet und in Mengen zu 0,1 ml auf Skirrow-Agar ausgespatelt. Durch Anzucht im mikroaerophilen Milieu (48 Stunden bei 42°C) wurde versucht, *Campylobacter jejuni* zu reisolieren.

Die Kontrollen erfolgten wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben.

#### 4.2.6 Experimentelle Inokulation von *Campylobacter jejuni* in Rohmilch

Vorgehensweise wie in Abschnitt 4.2.5 beschrieben .

Bei dieser Milch ist nicht nur eine zum Teil erhebliche Begleitflora vorhanden, sondern diese unbehandelte Milch unterliegt raschen physikalischen und chemischen Veränderungen.

Die Kontrollen erfolgten wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben.

#### 4.2.7 Auswertung

Die Auswertung der Platten erfolgte wie in Abschnitt 3.1.3.3 beschrieben.

---

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Voruntersuchungen

Im Zuge der Voruntersuchungen zur Ermittlung der Keimbelastung (siehe Abschnitt 4.2.4.1) konnten in keiner der Rohmilchplanproben *Campylobacter spp.* nachgewiesen werden (vgl. auch Abschnitt 3.2).

Alle Kontrollen verliefen erwartungsgemäß (siehe Abschnitt 4.2.1.2).

#### 4.3.2 Untersuchungen zum Überleben von *Campylobacter jejuni* nach experimenteller Inokulation in verschiedenen Milchen

Die Tabellen auf den folgenden Seiten geben die Untersuchungsergebnisse zum Überleben von *Campylobacter jejuni* in verschiedenen Milchen wieder.

Die Tabelleninhalte gliedern sich wie folgt:

---

<b>Tabellen</b>	<b>Inhalte</b>
	<b>Reisolierung von <i>Campylobacter jejuni</i> aus Rohmilch</b>
Tabelle 30 (Seite 69) :	Überleben von <i>C. jejuni</i> in schwach (+), mittelstark (++) und stark (+++) fremdkeimbelasteten Rohmilchplanproben, die jeweils mit Keimzahlen von ca. 100 KBE/ml, 500 KBE/ml und 10 <sup>4</sup> KBE/ml <i>C. jejuni</i> beimpft wurden.
Tabelle 38 (Seite 73)	
	<b>Orientierende Begleituntersuchungen</b>
Tabelle 39 (Seite 74) :	• Reisolierung von <i>Campylobacter jejuni</i> aus UHT-Milchen
Tabelle 47 (Seite 78)	Überleben von <i>C. jejuni</i> in UHT-Milchen mit einem Fettgehalt von 0,3%, 1,5% bzw. 3,5%, die jeweils mit Keimzahlen von circa 100 KBE/ml, 500 KBE/ml und 10 <sup>4</sup> KBE/ml <i>C. jejuni</i> beimpft wurden.
Tabelle 48 (Seite 79) :	• Reisolierung von <i>Campylobacter jejuni</i> aus pasteurisierten Milchen
Tabelle 50 (Seite 80)	Überleben von <i>C. jejuni</i> in pasteurisierten Milchen mit einem Fettgehalt von 1,5% bzw. 3,5%, die jeweils mit Keimzahlen von circa 100 KBE/ml, 500 KBE/ml und 10 <sup>4</sup> KBE/ml <i>C. jejuni</i> beimpft wurden.

---

Die Spaltenüberschriften „Bebrütungstemperatur“ und „Bebrütungsdauer“ in den Tabellen beziehen sich auf die Lagerbedingungen für die inokulierten Milchen. Aus Gründen einer einfachen Referenzierung sind die einzelnen untersuchten Milchproben fortlaufend nummeriert.

Da sich das Keimwachstum von *Campylobacter jejuni* auf den Selektivnährböden in verschiedenen Ausprägungen zeigte, von vielen winzigen, nicht zählbaren, über einzelne, klar abgegrenzte Kolonien bis hin zu flächendeckenden Schwärmmrasen, werden in den Tabellen zu den Untersuchungsergebnissen die in Tabelle 29 aufgelisteten Abkürzungen verwendet.

**Tabelle 29**    **Verwendete Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
..K	Anzahl von klar abgrenzbaren <i>Campylobacter-jejuni</i> -Kolonien
SR	Großflächiger <i>Campylobacter-jejuni</i> -Schwärmmrasen. Vor allem bei kurzen Bebrütungsdauern der beimpften Milchen bedeckte der <i>Campylobacter-jejuni</i> -Schwärmmrasen meist den gesamten Nährboden.
vwK	Viele winzige <i>Campylobacter-jejuni</i> -Kolonien (nicht zählbar)
kl. SR	Kleiner <i>Campylobacter-jejuni</i> -Schwärmmrasen
W	Wachstum von <i>Campylobacter jejuni</i> in Form von vielen winzigen Kolonien und zusätzlich kleinere Schwärmmrasen (nicht zählbar)
[W]	wie „W“, jedoch zusätzlich Wachstum von Begleitflora
BF	Wachstum von Begleitflora
-	Keinerlei Keimwachstum
-x-	Eine Auswertung der Milchprobe erschien wegen Denaturierung der Rohmilch nicht mehr sinnvoll. Der Milchcharakter war bereits stark verändert, die Rohmilch war teilweise geronnen und hatte einen widerlichen Geruch, so daß sie zum Konsum ohnehin nicht mehr in Frage käme.

Der Begriff „Wachstum“ steht hier für die kulturelle Reisolierung des Erregers aus der inokulierten Milch, nicht aber für dessen Vermehrung während der Lagerung der Milch.

Trotz ausschließlicher Verwendung von *Campylobacter*-Selektivnährböden setzte sich gelegentlich die konkurrierende Begleitflora teilweise oder sogar großflächig durch.

**Tabelle 30 Überleben von *C. jejuni* in schwach keimbelasteter Rohmilch (I)**

Inokulierte Keimmenge: ca.  $10^4$  KBE/ml

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	[W]	BF	BF	1
	W	W	[W]	BF	BF	2
	W	W	W	W	W	3
10 °C	W	[W]	[W]	BF	BF	4
	W	[W]	BF	BF	BF	5
20 °C	[W]	[W]	[W]	BF	-x-	6
	W	[W]	BF	BF	-x-	7
25 °C	W	BF	BF	BF	-x-	8
	W	[W]	[W]	[W]	-x-	9
30 °C	W	W	BF	BF	-x-	10
	W	[W]	BF	BF	-x-	11
37 °C	W	W	[W]	BF	-x-	12
	W	W	W	[W]	-x-	13
42 °C	W	W	W	[W]	-x-	14
	W	W	W	[W]	-x-	15

**Tabelle 31 Überleben von *C. jejuni* in mittelstark keimbelasteter Rohmilch (I)**

Inokulierte Keimmenge: ca.  $10^4$  KBE/ml

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	BF	BF	BF	16
	W	W	[W]	BF	BF	17
10 °C	[W]	[W]	[W]	BF	BF	18
	[W]	[W]	BF	BF	BF	19
20 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	20
	[W]	BF	BF	BF	-x-	21
25 °C	[W]	BF	BF	BF	-x-	22
	BF	BF	BF	BF	-x-	23
30 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	24
	[W]	[W]	BF	BF	-x-	25
37 °C	W	W	BF	BF	-x-	26
	W	[W]	BF	BF	-x-	27
42 °C	W	W	BF	BF	-x-	28
	W	W	[W]	BF	-x-	29

**Tabelle 32 Überleben von *C. jejuni* in stark keimbelasteter Rohmilch (I)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 10<sup>4</sup> KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	BF	BF	BF	30
	W	[W]	BF	BF	BF	31
10 °C	[W]	[W]	BF	BF	BF	32
	[W]	BF	BF	BF	BF	33
20 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	34
	[W]	[W]	BF	BF	-x-	35
25 °C	BF	BF	BF	BF	-x-	36
	[W]	BF	BF	BF	-x-	37
30 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	38
	W	[W]	BF	BF	-x-	39
37 °C	[W]	BF	BF	BF	-x-	40
	W	[W]	BF	BF	-x-	41
42 °C	W	[W]	BF	BF	-x-	42
	W	W	BF	BF	-x-	43

**Tabelle 33 Überleben von *C. jejuni* in schwach keimbelasteter Rohmilch (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	[W]	[W]	[W]	44
	W	W	[W]	[W]	[W]	45
	W	W	W	W	W	46
	W	W	W	W	BF	47
10 °C	W	W	W	BF	BF	48
	W	W	[W]	[W]	BF	49
20 °C	W	BF	BF	BF	-x-	50
	BF	BF	BF	BF	-x-	51
25 °C	W	W	W	BF	-x-	52
	W	BF	BF	BF	-x-	53
30 °C	W	W	W	[W]	-x-	54
	W	W	W	[W]	-x-	55
37 °C	W	W	BF	BF	-x-	56
	W	W	BF	BF	-x-	57
42 °C	W	W	W	W	-x-	58
	W	W	[W]	BF	-x-	59

**Tabelle 34 Überleben von *C. jejuni* in mittelstark keimbelasteter Rohmilch (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	[W]	BF	BF	60
	W	W	W	W	BF	61
10 °C	[W]	[W]	[W]	[W]	[W]	62
	W	W	[W]	[W]	BF	63
20 °C	W	W	[W]	BF	-x-	64
	W	[W]	BF	BF	-x-	65
25 °C	W	W	BF	BF	-x-	66
	[W]	BF	BF	BF	-x-	67
30 °C	W	W	BF	BF	-x-	68
	W	[W]	BF	BF	-x-	69
37 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	70
	W	BF	BF	BF	-x-	71
42 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	72
	W	BF	BF	BF	-x-	73

**Tabelle 35 Überleben von *C. jejuni* in stark keimbelasteter Rohmilch (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	BF	BF	BF	74
	W	[W]	BF	BF	BF	75
10 °C	[W]	[W]	BF	BF	BF	76
	BF	BF	BF	BF	BF	77
20 °C	W	[W]	BF	BF	-x-	78
	[W]	BF	BF	BF	-x-	79
25 °C	BF	BF	BF	BF	-x-	80
	[W]	BF	BF	BF	-x-	81
30 °C	W	W	BF	BF	-x-	82
	W	W	[W]	BF	-x-	83
37 °C	W	[W]	BF	BF	-x-	84
	[W]	[W]	BF	BF	-x-	85
42 °C	[W]	[W]	BF	BF	-x-	86
	W	BF	BF	BF	-x-	87

**Tabelle 36 Überleben von *C. jejuni* in schwach keimbelasteter Rohmilch (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer						Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	
4 °C	28K+BF	10K+BF	7K+BF	6K+BF	8K+BF	BF	88
	19K+BF	12K+BF	6K+BF	6K+BF	4K+BF	BF	89
10 °C	5K+BF	4K+BF	4K+BF	2K+BF	BF	BF	90
	2K+BF	2K+BF	1K+BF	BF	BF	BF	91
20 °C	4K+BF	3K+BF	BF	BF	-x-	-x-	92
	3K+BF	1K+BF	BF	BF	-x-	-x-	93
25 °C	5K+BF	1K+BF	BF	BF	-x-	-x-	94
	6K+BF	3K+BF	BF	BF	-x-	-x-	95
30 °C	1K+BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	96
	4K+BF	1K+BF	BF	BF	-x-	-x-	97
37 °C	7K+BF	7K+BF	BF	BF	-x-	-x-	98
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	99
42 °C	-	-	BF	BF	-x-	-x-	100
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	101

**Tabelle 37 Überleben von *C. jejuni* in mittelstark keimbelasteter Rohmilch (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer						Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	
4 °C	23K+BF	11K+BF	6K+BF	2K+BF	BF	BF	102
	12K+BF	3K+BF	BF	BF	BF	BF	103
10 °C	10K+BF	5K+BF	BF	BF	BF	BF	104
	9K+BF	2K+BF	BF	BF	BF	BF	105
20 °C	3K+BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	106
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	107
25 °C	1K+BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	108
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	109
30 °C	1K+BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	110
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	111
37 °C	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	112
	3K+BF	3K+BF	BF	BF	-x-	-x-	113
42 °C	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	114
	BF	BF	BF	BF	-x-	-x-	115

**Tabelle 38 Überleben von *C. jejuni* in stark keimbelasteter Rohmilch (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer						Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	
4 °C	BF	BF	BF	BF	BF	BF	116
	BF	BF	BF	BF	BF	BF	117
10 °C	BF	BF	BF	BF	BF	BF	118
	BF	BF	BF	BF	BF	BF	119
20 °C	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	120
	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	121
25 °C	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	122
	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	123
30 °C	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	124
	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	125
37 °C	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	126
	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	127
42 °C	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	128
	BF	BF	BF	-x-	-x-	-x-	129

Erwartungsgemäß zeigte sich in Rohmilch der Einfluß konkurrierender Begleitflora sowie der inokulierten Keimmenge in Verbindung mit der Inkubationsdauer und -temperatur am deutlichsten.

In stark keimbelasteter Rohmilch war *Campylobacter jejuni* bei einer inokulierten Keimmenge von 100 KBE/ml nicht mehr reisolierbar. Bei inokulierten Keimzahlen von 500 KBE/ml und ca.  $10^4$  KBE/ml konnten einzelne Kolonien und kleinere Schwärmmassen bei allen Temperaturen bis zwei Stunden nach Inkubationsbeginn nachgewiesen werden.

In mittelstark keimbelasteter Rohmilch war die Reisolierung von *Campylobacter jejuni* bei niedrigen Temperaturen noch nach vier und sechs Stunden Inkubationsdauer möglich, bei einer inokulierten Keimmenge von ca.  $10^4$  KBE/ml sogar noch nach 24 Stunden bei 42°C Bebrütungstemperatur.

In schwach keimbelasteter Rohmilch gelang die Reisolierung am besten. Selbst bei der niedrigsten inokulierten Keimzahl konnte *Campylobacter jejuni* bei 4°C und 10°C bis acht Stunden nach Inkubationsbeginn nachgewiesen werden.

**Tabelle 39 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 0,3% Fettgehalt (I)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 10<sup>4</sup> KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	-	130
	SR	SR	SR	SR	SR	131
10 °C	SR	SR	SR	SR	SR	132
	SR	SR	SR	SR	SR	133
20 °C	SR	SR	SR	SR	-	134
	SR	SR	-	-	-	135
25 °C	SR	SR	SR	SR	-	136
	SR	SR	SR	-	-	137
30 °C	SR	SR	SR	SR	8K	138
	SR	SR	SR	SR	-	139
37 °C	SR	SR	SR	SR	-	140
	SR	SR	SR	SR	SR	141
42 °C	SR	SR	SR	SR	-	142
	SR	SR	SR	SR	SR	143

**Tabelle 40 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 0,3% Fettgehalt (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	SR	144
	SR	SR	SR	SR	SR	145
10 °C	SR	SR	SR	4K	-	146
	SR	SR	SR	3K	-	147
20 °C	SR	SR	1K	-	-	148
	SR	SR	-	-	-	149
25 °C	SR	SR	3K	-	-	150
	SR	4K	1K	-	-	151
30 °C	SR	SR	SR	-	-	152
	SR	SR	SR	-	-	153
37 °C	SR	SR	SR	SR	SR	154
	SR	SR	SR	SR	SR	155
42 °C	SR	SR	SR	SR	SR	156
	SR	SR	SR	SR	SR	157

**Tabelle 41 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 0,3% Fettgehalt (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	12K	13K	4K	10K	8K	158
	15K	14K	11K	8K	9K	159
10 °C	15K	9K	-	-	-	160
	19K	16K	10K	4K	1K	161
20 °C	3K	-	-	-	-	162
	13K	3K	-	-	-	163
25 °C	4K	8K	7K	-	-	164
	11K	7K	2K	1K	-	165
30 °C	kl. SR	kl. SR	12K	-	vwK	166
	kl. SR	kl. SR	17K	4K	-	167
37 °C	kl. SR	kl. SR	kl. SR	19K	vwK	168
	kl. SR	kl. SR	kl. SR	kl. SR	vwK	169
42 °C	kl. SR	kl. SR	kl. SR	3K	-	170
	kl. SR	kl. SR	kl. SR	kl. SR	vwK	171

**Tabelle 42 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 1,5% Fettgehalt (I)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 10<sup>4</sup> KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	SR	172
	SR	SR	SR	SR	SR	173
10 °C	SR	SR	SR	SR	SR	174
	SR	SR	SR	SR	SR	175
20 °C	SR	SR	SR	-	-	176
	SR	SR	8K	-	-	177
25 °C	SR	SR	SR	SR	-	178
	SR	SR	SR	SR	-	179
30 °C	SR	SR	SR	SR	-	180
	SR	SR	SR	13K	3K	181
37 °C	SR	SR	SR	SR	SR	182
	SR	SR	SR	SR	SR	183
42 °C	SR	SR	SR	SR	SR	184
	SR	SR	SR	SR	SR	185

**Tabelle 43 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 1,5% Fettgehalt (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	SR	186
	SR	SR	SR	SR	SR	187
10 °C	SR	SR	SR	SR	SR	188
	SR	SR	SR	SR	SR	189
20 °C	SR	SR	SR	-	-	190
	SR	SR	-	-	-	191
25 °C	SR	SR	SR	-	-	192
	SR	SR	SR	-	-	193
30 °C	SR	SR	SR	SR	-	194
	SR	SR	SR	SR	SR	195
37 °C	SR	SR	SR	SR	SR	196
	SR	SR	SR	SR	SR	197
42 °C	SR	SR	SR	SR	-	198
	SR	SR	SR	SR	SR	199

**Tabelle 44 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 1,5% Fettgehalt (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	W	W	W	W	W	200
	W	W	W	W	W	201
10 °C	W	W	W	W	12K	202
	W	W	W	W	8K	203
20 °C	W	W	12K	-	-	204
	W	W	5K	-	-	205
25 °C	W	W	17K	-	-	206
	W	W	11K	2K	-	207
30 °C	W	W	13K	-	-	208
	W	W	16K	9K	-	209
37 °C	W	W	W	W	W	210
	W	W	W	W	W	211
42 °C	W	W	W	W	W	212
	W	W	W	W	W	213

**Tabelle 45 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 3,5% Fettgehalt (I)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 10<sup>4</sup> KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	SR	214
	SR	SR	SR	SR	SR	215
10 °C	SR	SR	SR	SR	5K	216
	SR	SR	SR	SR	2K	217
20 °C	SR	6K	1K	-	-	218
	SR	3K	2K	-	-	219
25 °C	SR	SR	9K	-	-	220
	SR	SR	-	-	-	221
30 °C	SR	SR	SR	-	-	222
	SR	SR	SR	-	-	223
37 °C	SR	SR	SR	SR	SR	224
	SR	SR	SR	SR	SR	225
42 °C	SR	SR	SR	SR	SR	226
	SR	SR	SR	SR	SR	227

**Tabelle 46 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 3,5% Fettgehalt (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	SR	SR	SR	SR	SR	228
	SR	SR	SR	SR	SR	229
10 °C	SR	SR	2K	2K	-	230
	SR	SR	5K	1K	-	231
20 °C	SR	3K	2K	-	-	232
	SR	4K	-	-	-	233
25 °C	SR	4K	-	-	-	234
	SR	1K	-	-	-	235
30 °C	SR	SR	SR	-	-	236
	SR	SR	SR	SR	-	237
37 °C	SR	SR	SR	1K	-	238
	SR	SR	SR	SR	SR	239
42 °C	SR	SR	SR	SR	SR	240
	SR	SR	SR	SR	SR	241

**Tabelle 47 Überleben von *C. jejuni* in UHT-Milch mit 3,5% Fettgehalt (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4°C	SR	SR	SR	6K	-	242
	SR	SR	SR	5K	-	243
10°C	SR	-	-	-	-	244
	SR	1K	-	-	-	245
20°C	SR	-	-	-	-	246
	SR	1K	-	-	-	247
25°C	SR	-	-	-	-	248
	SR	-	-	-	-	249
30°C	SR	SR	-	-	-	250
	SR	SR	4K	-	-	251
37°C	SR	SR	SR	8K	-	252
	SR	SR	SR	6K	-	253
42°C	SR	SR	SR	SR	SR	254
	SR	SR	SR	SR	SR	255

Aus der beimpften UHT-Milch war *Campylobacter jejuni* sehr gut reisolierbar. Auf den Nährböden überwog das Keimwachstum in Form von Schwärmmrasen unterschiedlichster Größe, meist ohne erkennbare Ausgangskolonien. Bei Inkubationstemperaturen von 4°C und 10°C sowie bei 37°C und 42°C war der Erreger nach 24stündiger Bebrütung immer noch nachweisbar.

**Tabelle 48 Überleben von *C. jejuni* in pasteurisierten Milchen (I)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 10<sup>4</sup> KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Fett- gehalt	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
		1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	SR	256
	3,5%	SR	SR	SR	SR	SR	257
10 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	-	258
	3,5%	SR	SR	SR	SR	SR	259
20 °C	1,5%	SR	SR	-	-	-	260
	3,5%	SR	SR	-	-	-	261
25 °C	1,5%	SR	-	-	-	-	262
	3,5%	SR	4K	-	-	-	263
30 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	-	264
	3,5%	SR	SR	SR	-	-	265
37 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	-	266
	3,5%	SR	SR	SR	SR	SR	267
42 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	SR	268
	3,5%	SR	SR	SR	SR	SR	269

**Tabelle 49 Überleben von *C. jejuni* in pasteurisierten Milchen (II)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 500 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Fett- gehalt	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
		1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	SR	270
	3,5%	SR	SR	SR	SR	SR	271
10 °C	1,5%	SR	SR	2K	2K	-	272
	3,5%	SR	SR	-	-	-	273
20 °C	1,5%	SR	3K	2K	-	-	274
	3,5%	SR	SR	-	-	-	275
25 °C	1,5%	SR	4K	-	-	-	276
	3,5%	SR	-	-	-	-	277
30 °C	1,5%	SR	SR	SR	-	-	278
	3,5%	SR	SR	9K	-	-	279
37 °C	1,5%	SR	SR	SR	1K	-	280
	3,5%	SR	SR	-	-	-	281
42 °C	1,5%	SR	SR	SR	SR	SR	282
	3,5%	SR	SR	SR	-	-	283

**Tabelle 50 Überleben von *C. jejuni* in pasteurisierten Milchen (III)**

**Inokulierte Keimmenge: ca. 100 KBE/ml**

Bebrütungs- temperatur	Fett- gehalt	Bebrütungsdauer					Ifd. Nr.
		1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	
4 °C	1,5%	W	W	W	W	-	284
	3,5%	W	W	W	W	W	285
10 °C	1,5%	W	W	2K	-	-	286
	3,5%	W	W	W	W	W	287
20 °C	1,5%	W	8K	-	-	-	288
	3,5%	W	5K	-	-	BF	289
25 °C	1,5%	W	1K	-	-	-	290
	3,5%	W	4K	-	-	-	291
30 °C	1,5%	W	W	W	-	-	292
	3,5%	W	W	W	-	-	293
37 °C	1,5%	W	W	BF	BF	BF	294
	3,5%	W	W	W	-	-	295
42 °C	1,5%	W	W	W	W	W	296
	3,5%	W	W	W	W	BF	297

Bei Inkubationstemperaturen von 4 °C und 10 °C sowie bei 42 °C war *Campylobacter jejuni* nach 24stündiger Bebrütung immer noch nachweisbar.