

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

**Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen
und molekularbiologischen Nachweis
von thermotoleranten *Campylobacter* spp.
in Geflügelfleisch**

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

vorgelegt von
Carsten Opfer
Tierarzt aus Bad Hersfeld

Berlin 2008
Journal Nr.: 3253

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: PD Dr. Lüppo Ellerbroek
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gerd Schlenker

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Campylobacter, poultry-meat, microbial-contamination, detection,
enrichment, polymerase-chain-reaction

Tag der Promotion: 14.10.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-491-5

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mbv** 2008

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

Meinen Eltern und meiner Oma Christine in Dankbarkeit

Inhalt

1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Klassifizierung und Charakterisierung des Keims	2
2.2 Tenazität und Wachstumsanforderungen	3
2.3 Campylobacteriose des Menschen	6
2.4 Epidemiologie der humanen Campylobacteriose	10
2.4.1 Indirekte Übertragung	10
2.4.2 Direkte Übertragung	12
2.4.3 Reservoir und Übertragungswege	13
2.4.4 <i>Campylobacter</i> -Prävalenz bei Lebensmitteln im Einzelhandel	16
2.5 Nachweisverfahren für thermotolerante <i>Campylobacter</i> in Lebensmitteln	19
2.5.1 Mikrobiologische Nachweisverfahren	19
2.5.2 Identifizierung und Differenzierung	25
2.5.3 Keimzahlbestimmung	26
2.5.4 Molekularbiologischer Nachweis und Speziesdifferenzierung	28
2.5.5 Sonstige Schnellmethoden	34
3 Eigene Untersuchungen	36
3.1 Studie 1: Vergleich kultureller Verfahren zum Nachweis von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. in Geflügelfleisch	36
3.1.1 Material	36
3.1.2 Methodik - Durchführung	39
3.2 Studie 2: Vergleich zweier PCR-Systeme für das Screening auf thermotolerante <i>Campylobacter</i> spp. in Geflügelfleisch	44
3.1.1 Material	44
3.2.2 Methodik - Durchführung	46
4 Ergebnisse	52
4.1 Studie 1: Vergleich kultureller Verfahren zum Nachweis von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. in Geflügelfleisch	52
4.1.1 Nachweisraten von <i>Campylobacter</i> in natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch	52
4.1.2 Ergebnisse des Methodenvergleichs	53
4.1.3 Ergebnisse der quantitativen und semiquantitativen Untersuchungen	57
4.1.4 Mikrobiologischer Status der Geflügelfleischprodukte	57

4.2	Studie 2: Vergleich zweier PCR-Systeme für das Screening auf thermotolerante <i>Campylobacter</i> spp. in Geflügelfleisch	60
4.2.1	Ergebnisse des Methodenvergleichs	60
5	Diskussion	62
5.1	Problemstellung / Fragestellung	62
5.2	Nachweisraten von <i>Campylobacter</i> spp. in Geflügelfleisch	62
5.3	Quantitative und semiquantitative Erfassung der <i>Campylobacter</i> -Kontamination von Geflügelfleisch	64
5.4	Vergleich kultureller Nachweisverfahren	64
5.5	Vergleich zweier PCR-Verfahren	66
6	Zusammenfassung	68
7	Summary	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang	104

Abkürzungen

\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
°C	Grad Celsius
C.	Campylobacter
µl	Mikroliter
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AFLP	<u>a</u> mplified <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism (Genotypisierungsmethode)
Anon.	Anonymus
a _w -Wert	„Wasseraktivität“ (Maß für das frei verfügbare Wasser in Lebensmitteln ausgedrückt durch den Quotienten aus Wasserdampfdruck Lebensmittel zum Dampfdruck des Wassers bei gegebener Temperatur)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Campy-BAP	Campy- <u>b</u> rucella <u>a</u> gar <u>p</u> late (Selektivnährboden)
CAT Agar	<u>c</u> efoperazone- <u>a</u> mphotericin- <u>t</u> eicoplanin agar (Selektivnährboden)
CCD	<u>c</u> harcoal- <u>c</u> efoperazone- <u>d</u> esoxycholate (Nährmedium)
CEB	<u>c</u> ampylobacter <u>e</u> nrichment <u>b</u> roth (Nährmedium)
cm	Zentimeter
D-Wert	<u>D</u> ezimale Reduktionszeit (Maß für die Hitzeempfindlichkeit bzw. –resistenz von Mikroorganismen. Der D-Wert gibt die Zeit an, in der eine vorhandene Population bei Einwirkung einer bestimmten Temperatur auf ein Zehntel vermindert wird. Die jeweilige Temperatur wird dabei als Index zu D geschrieben.)
DIG	Digoxygenin
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
ELFA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>f</u> luorescent <u>a</u> ssay (immunologisches Nachweisverfahren)
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay (immunologisches Nachweisverfahren)
EFSA	European Food Safety Authority
et al.	und andere
FAO	Food and Agricultural Organization
FBP	<u>f</u> errous sulphate, sodium metabisulphite, and sodium <u>p</u> yruate (Supplement)
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
gr.	griechisch
h	Stunde
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IfSG	Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG). Verkündet als Art. 1 des Gesetzes zur Neuordnung seuchenrechtlicher Vorschriften (Seuchenrechtsneuordnungsgesetz – SeuchRNeuG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. S. 1045); gültig ab 01.01.2001
incl.	inclusive
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Kolonie-bildende Einheiten

kGy	Kilogray (Maßeinheit für die absorbierte Energiemenge)
l	Liter
lat.	lateinisch
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26.04.2006 (BGBl. I S. 945)
LMBG	Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) vom 09.09.1997 (BGBl. I S. 2296) zuletzt geändert am 13.05.2004 (BGBl. I S. 934)
log	Logarithmus
Lsg.	Lösung
lt.	laut
max.	Maximum
mCCDA	<u>m</u> odified <u>ch</u> arcoal <u>ce</u> foperazone <u>d</u> esoxycholate <u>a</u> gar (Selektivnährboden)
mg	Milligramm
MID	Minimale infektiöse Dosis
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPN	Most Probable Number
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese (Genotypisierungsmethode)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
s	Standardabweichung
s.	siehe
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat
sec	Sekunde
snPCR	<u>s</u> emi <u>n</u> ested <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
spec.	Species (Singular), eine nicht näher bezeichnete Art einer bestimmten Gattung
spp.	Species (Plural)
SSM	<u>s</u> elective- <u>g</u> emisolid <u>m</u> edium (Nährmedium)
ssp.	Subspecies
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TSI	<u>t</u> riple- <u>s</u> ugar- <u>i</u> ron agar (syn. Eisen-Dreizucker-Schrägagar)
U	unit (Internationale Einheit für Enzymaktivität)
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Thermotolerante *Campylobacter* spp. gehören in Deutschland zu den häufigsten Erregern bakterieller Darminfektionen beim Menschen mit stetig steigender Tendenz. Im Jahre 2005 überstieg die Zahl der durch *Campylobacter* spp. verursachten Diarrhoen in der Bundesrepublik erstmals die Zahl der durch *Salmonella* bedingten Infektionen. Vergleichsweise geringe Erregerzahlen können bereits zu einer Erkrankung führen. Die Aufnahme erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel, wobei ungenügend erhitztes Geflügelfleisch, durch mangelnde Küchenhygiene kontaminierte verzehrfertige Speisen und Rohmilch als wichtigste Vektoren gelten.

Seit Anfang der achtziger Jahre sind eine Vielzahl von Nährmedien und kulturellen Nachweisverfahren für *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln vorgeschlagen worden. Auf internationaler Ebene erfolgte eine erste Normierung eines kulturellen Nachweisverfahrens im Jahr 1995 mit der Veröffentlichung der ISO-Norm 10272 (E). Es handelt sich um ein horizontales Verfahren zum Nachweis thermotoleranter *Campylobacter* mit der Möglichkeit der Selektivanreicherung im Flüssigmedium nach Preston oder nach Park und Sanders. Letzteres wird für die Untersuchung von Proben empfohlen, bei denen die Mikroflora durch technologische Einflüsse, wie beispielsweise Tiefgefrieren, gestresst sein könnte. Die beiden Selektivanreicherungsverfahren unterscheiden sich hinsichtlich der Zusammensetzung des Basalmediums, der Antibiotika-Supplementation sowie der Inkubationstemperatur und -dauer.

Dem hohen Gesundheitsrisiko steht noch Ende der 1990er Jahre eine relativ geringe Untersuchungsaktivität gegenüber. Geflügelfleisch ist nach den Meldungen der Bundesländer das einzige Lebensmittel, bei dem nennenswerte Isolierungsraten von thermotoleranten *Campylobacter* spp. erzielt wurden. Dabei kamen je nach Untersuchungseinrichtung verschiedene kulturelle Nachweisverfahren zum Einsatz (ANON., 1998b). Dies kann als ein Indiz für die generellen Schwierigkeiten beim Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln gewertet werden. Die kulturellen Prüfverfahren sind zudem mit einem nicht unerheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden.

Als Alternative zu kulturellen Techniken werden auch im Routinelabor zunehmend molekularbiologische Verfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingeführt, die ein schnelles Screening von Lebensmittelproben ermöglichen. Im Jahr 2000 wurde erstmals von der Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Methoden“ der Kommission zur Durchführung des § 35 LMBG ein Vorschlag für ein PCR-basiertes Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln veröffentlicht (ANON., 2000).

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss verschiedener kultureller Anreicherungsverfahren in Anlehnung an die ISO 10272:1995 (E) auf die Isolierungsrate von *Campylobacter* spp. bei natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten bestimmt werden. Ferner wurde die Notwendigkeit einer Blut-Supplementation der Preston-Bouillon sowie der Effekt unterschiedlicher Inkubationszeiten überprüft. Im weiteren Verlauf wurde ergänzend die Einsatzmöglichkeit zweier PCR-Verfahren für ein schnelles und sensitives Screening von Lebensmittelproben auf *Campylobacter* spp. untersucht.

2 Literatur

2.1 Klassifizierung und Charakterisierung des Keims

Campylobacter (gr. *kampylos*: gebogen, gr. *bakterion*: Stab) sind schlanke, gebogene, S-förmige oder spiralig gewundene, asporogene, gramnegative Stäbchen mit einer Breite von 0,2 bis 0,9 µm und einer Länge von 0,5 bis 5 µm (Abb. 1). In älteren Kulturen treten häufig kokkoide Zelltypen auf. *Campylobacter*-Zellen bilden eine mono- oder bipolare monotriche Begeißelung aus, was zu einer typischen korkenzieherartigen Bewegung führt (VANDAMME und DE LEY, 1991). Die Geißel kann die Bakterienzelle hinsichtlich der Länge um das zwei- bis dreifache übersteigen und besteht aus den nicht umscheideten, hochgradig variablen Flagellin-Untereinheiten A und B, welche durch die Gene *flaA* und *flaB* kodiert werden (NUIJTEN et al., 1990).

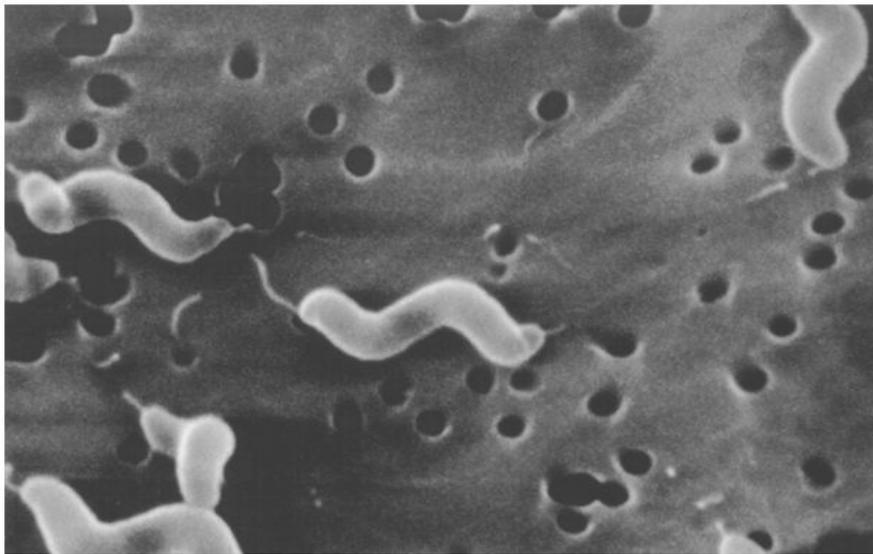


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *C. jejuni*-Zellen auf einem 0,65 µm-Membranfilter (entnommen aus ALTEKRUSE et al., 1999)

Taxonomisch umfasst die Familie der *Campylobacteriaceae* die Gattung *Campylobacter* mit den Spezies *C. mucosalis*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. showae*, *C. rectus*, *C. sputorum*, *C. gracilis*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. coli*, *C. jejuni*, *C. hominis* sp. nov. und *C. lanienae* sp. nov. sowie die Gattung *Arcobacter* mit den Spezies *A. nitrofigilis*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* sp. nov. und *A. halophilus* sp. nov. (LOGAN et al., 2000 ; LAWSON et al., 2001; ON, 2001; DONACHIE et al., 2005; HOUF et al., 2005).

Die Bakterien der Gattung *Campylobacter* zeichnen sich durch einen speziellen Metabolismus mit einer geringen biochemischen Aktivität und durch besondere Wachstumsanforderungen aus. Sie benötigen eine mikroaerobe Atmosphäre (5 – 7 % O₂). Alle Spezies besitzen Oxidase-Aktivität, reagieren im Methylrot- und Voges-Proskauer-Test negativ, können Gelatine nicht verflüssigen und sind chemoorganotroph. Als Energiequelle werden zahlreiche organische Säuren, vor allem aus dem Tricarbonsäurezyklus, und Aminosäuren genutzt. Kohlenhydrate werden weder oxidativ noch fermentativ abgebaut (KIST, 1991; VANDAMME und DE LEY, 1991).

Nur wenige phänotypische Unterscheidungskriterien stehen hinsichtlich der Speziesdifferenzierung zur Verfügung. Die wichtigsten Differenzierungsmerkmale innerhalb der Gattung *Campylobacter* sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Als humanpathogene Durchfallerreger spielen *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* und in geringem Maße auch *Campylobacter lari* und *Campylobacter upsaliensis* eine Rolle. Sie bilden innerhalb der

Gattung eine phylogenetisch eng verwandte Gruppe mit einem Wachstumsoptimum bei 43 °C und werden daher auch als thermophile bzw. thermotolerante *Campylobacter* spp. bezeichnet (ISO, 1995; KIST, 1996; ON, 2001).

Tab. 1: Differenzierungsmerkmale ausgewählter Spezies der Gattung *Campylobacter* (nach VANDAMME, 2000)

	Taxon																
	<i>C. concisus</i>	<i>C. curvus</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	<i>C. gracilis</i>	<i>C. helveticus</i>	<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	<i>C. mucosalis</i>	<i>C. rectus</i>	<i>C. showae</i>	<i>C. sputorum</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaltensis</i>
alpha-Hämolyse	v	v	-	v	-	+	v	v	-	+	+	+	v	+	+	v	+
Katalase	-	-	+	v*	v	-	+	+	-	v	+	v	+	v	+	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-	-	v	-
Hippurikase	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Indoxylacetase	-	v	-	-	v	+	-	-	-	+	v	-	+	+	+	-	+
H ₂ S Produktion (TSI)	-	v	-	-	-	-	+	+	+	-	v	+	v	-	-	-	-
Wachstum bei																	
25 °C	-	-	+	+	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 °C	v	v	v*	-	v	+	+	+	+	v	v	+	+	-	+	+	v*
Resistenz gegenüber																	
Cephalothin	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	+	-	+	+	v
Nalidixinsäure	v	+	+	v	v	-	+	+	v*	v*	-	v	-	-	-	v	-

Legende: +, Merkmal in > 90 % der Stämme vorhanden; -, Merkmal in < 11 % der Stämme vorhanden; v, Stamm-abhängig; v*, in 80-89 % der Stämme vorhanden

2.2 Tenazität und Wachstumsanforderungen

Unter dem Begriff Tenazität (lat. *tenacitas*: Festhalten) wird die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen gegenüber Umwelteinflüssen verstanden. Thermotolerante *Campylobacter* sind gegenüber äußeren Einflüssen empfindlich und besitzen spezielle Anforderungen an das Nährstoffangebot sowie die Wachstumsbedingungen. Ihre Tenazität wird insbesondere von Belastungsfaktoren wie zu hohen oder niedrigen Temperaturen und mangelnder Feuchtigkeit sowie oxidativem Stress beeinflusst (ICMSF, 1996). Wesentliche in-vitro Wachstumsanforderungen und –grenzen für *C. jejuni* sind in Tabelle 2 dargestellt.

Im Rahmen von Genomanalysen konnte das Fehlen wichtiger Regulatorgene aufgezeigt werden (PARKHILL et al., 2000). *Campylobacter* spp. fehlen somit im Vergleich zu anderen Bakterien wichtige Antwortmechanismen gegenüber externen Einflüssen, wie beispielsweise thermischem, osmotischem oder

oxidativem Stress. Die geringe Tenazität und die speziellen Nährstoff- und Wachstumsansprüche sind als hochgradige Anpassungen an die kommensalische Lebensweise im Gastrointestinaltrakt warmblütiger Tiere, dem natürlichen Habitat und Umweltreservoir der *Campylobacter* spp., anzusehen (PARK, 2002).

Tab. 2: Wachstumsanforderungen und –grenzen für *C. jejuni* (ICMSF, 1996)

	Minimum	Optimum	Maximum
Temperatur (°C)	32	42-43	45
pH	4,9	6,5-7,5	ca. 9
NaCl (%)	-	0,5	1,5
Wasseraktivität (a_w)	$\geq 0,987$	0,997	-
Atmosphäre	-	5 % O ₂ + 10 % CO ₂	-

Thermotolerante *Campylobacter* gehören aufgrund ihrer geringen Aerotoleranz zu den mikroaerophilen Mikroorganismen. HODGE und KRIEG (1994) konnten nachweisen, dass in-vitro bereits ein Sauerstoffgehalt von 15 % in der Atmosphäre zu einer Wachstumssuppression führt. Ein Sauerstoffgehalt von 5-7 % und ein Kohlendioxidgehalt von 10 % haben sich als optimale Atmosphäre für die Kultivierung erwiesen (ICMSF, 1996).

Gasgemische aus Stickstoff und Kohlendioxid werden in sogenannten modifiziert begasten Lebensmittelverpackungen (MAP, Modified Atmosphere Packaging) zur Verlangsamung von chemischen und mikrobiologischen Verderbsvorgängen unter anderem von Fleisch- und Fleischerzeugnissen eingesetzt. Verschiedene Studien stellten einen protrahierenden Effekt auf das Überleben von *C. jejuni* auf künstlich dotiertem Putenfleisch bzw. auf künstlich dotierten Geflügelhautfragmenten unter Vakuum und auch in CO₂-Atmosphäre fest (PHEBUS et al., 1991; LEE et al., 1998).

Eine Vermehrung von thermotoleranten *Campylobacter* in Lebensmitteln, die während der Verarbeitung und Lagerung bei Raumtemperatur und unter unzureichender Kühlung aufbewahrt wurden, lässt sich im Gegensatz zu anderen lebensmittelassoziierten bakteriellen Krankheitserregern nahezu ausschließen. Dieses Phänomen ist zum einen auf die unzureichende Aerotoleranz und zum anderen auf einen hinsichtlich der Temperaturanforderungen sehr eng begrenzten Wachstumsbereich von 32 °C bis 45 °C mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 42 °C zurückzuführen (PARK, 2002).

Thermotolerante *Campylobacter* gelten als hitzeempfindlich und werden im Rahmen von Pasteurisierungsverfahren und durch die üblichen küchentechnischen Erhitzungsprozesse sicher abgetötet. Die D₅₅-Werte von *C. jejuni* variieren in verschiedenen Lebensmitteln zwischen 0,6 und 2,3 min (ICMSF, 1996) (Tab. 3). Neueren Untersuchungen von MOORE und MADDEN (2000) zufolge besteht bei milden Erhitzungsprozessen die Möglichkeit, dass eine hitzeresistente Subpopulation überlebt und zu einer klinischen Infektion mit *Campylobacter* spp. führt. Im Rahmen einer Studie zur Bestimmung der Hitzetoleranz des *C. coli*-Wildstammes NI39 in phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurde im Temperaturbereich von 56,6 bis 62,5 °C eine nicht-logarithmische Reduktion der Keimzahlen beobachtet. Dieser von MOORE und MADDEN (2000) auch als „tailing effect“ bezeichnete spezifische Kurvenverlauf konnte bei anderen lebensmittelassoziierten Krankheitserregern, wie *Salmonella* Typhimurium oder *Listeria monocytogenes*, unter vergleichbaren Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden. Milde Erhitzungsprozesse spielen unter anderem bei der Zubereitung von Entenbrustfilets eine Rolle, denn bei der durchaus üblichen Zubereitung „rosa“ bzw. „rare“ werden regelmäßig Kerntemperaturen von nur 56 bis 60 °C erreicht (RENZ, 2007).

Thermotolerante *Campylobacter* überleben in gekühlten Lebensmitteln deutlich länger als in ungekühlt gelagerten Produkten (ICMSF, 1996). Während bei 4 °C die Überlebensdauer auf Geflügelhaut mehr als eine Woche beträgt, kommt es bei Raumtemperatur zu einem raschem Absterben von *C. jejuni* innerhalb

von drei Tagen (SVEDHEM et al., 1981; LEE et al., 1998).

Tab. 3: Hitzeresistenz von *Campylobacter jejuni* in Geflügelfleisch

Temperatur [°C]	D-Wert	Lebensmittel	Referenz
55	2,3 min	Geflügelhackfleisch	BLANKENSHIP und CRAVEN (1982)
57	1,0 min	Geflügelhackfleisch	BLANKENSHIP und CRAVEN (1982)
50	2,1 min	Geflügelhaut	YANG et al. (2001)
60	0,5 min	Geflügelhaut	YANG et al. (2001)

Beim Einfrieren von Lebensmitteln tritt initial eine starke Reduktion der *Campylobacter*-Keimzahlen um bis zu fünf \log_{10} -Stufen auf, gefolgt von einer verlangsamten Absterberate (ICMSF, 1996). SANDBERG et al. (2005) untersuchten die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter* auf natürlich kontaminierten Hähnchenkarkassen und fanden, dass es nach dreiwöchiger Gefrierlagerung zu einer Reduktion der Ausgangs-keimgehalte um zwei \log_{10} -Stufen kommt. Die Mikroorganismen können in Geflügelfleisch und auf Geflügelhautfragmenten unter Tiefkühlbedingungen mehrere Monate überleben (OOSTEROM et al., 1983; BEUCHAT, 1987; LEE et al., 1998; BHADURI und COTTRELL, 2004).

Campylobacter spp. stellen außerordentlich hohe Ansprüche an die Umgebungsfeuchtigkeit. Im Gegensatz zu vielen anderen lebensmittelassoziierten Verderbs- oder Krankheitserregern benötigen sie zur Vermehrung ein großes Maß an ungebundenem Wasser in der (Lebensmittel-)Matrix (a_w -Wert $\geq 0,987$). Ihre Tenazität auf trockenen glatten Oberflächen bei Raumtemperatur ist gering. Im Vergleich mit anderen lebensmittelassoziierten Krankheitserregern, wie *Salmonella* Enteritidis und *Staphylococcus aureus*, weist *C. jejuni* eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Lufttrocknung auf (KOSUMANIGRUM et al., 2003). Lebensfähige Keime können bei höheren Temperaturen häufig nur auf feuchten Oberflächen isoliert werden (DOYLE und ROMAN, 1982a,b).

Thermotolerante *Campylobacter* sind nicht in der Lage, hohe Kochsalzkonzentrationen im Kulturmedium zu überleben. Untersuchungen von DOYLE und ROMAN (1982b) zeigen, dass lediglich NaCl-Konzentrationen von bis zu 1,5 % toleriert werden.

Nach ICMSF (1996) liegen die optimalen pH-Werte für thermotolerante *Campylobacter* im neutralen Bereich, mit einem pH-Maximum bei 9. Der minimale pH-Wert, bei dem noch eine Vermehrung von *C. jejuni* stattfindet, wurde von DOYLE und ROMAN (1981) mit 4,9 angegeben. Die pH-Toleranz im sauren Milieu ist temperaturabhängig. Es gibt Hinweise darauf, dass verschiedene Lebensmittelmatrizes *C. jejuni* gegenüber einem extrem sauren Milieu (pH 2,5) schützen können (WATERMAN und SMALL, 1998).

Hydrostatischer Druck, wie er im Rahmen von High-Hydrostatic-Pressure-Processing(HPP)-Verarbeitung von Lebensmitteln angewandt wird, wirkt bereits in relativ niedriger Dosierung bakterizid. SOLOMON und HOOVER (2004) konnten im Rahmen einer HPP-Studie mit verschiedenen Lebensmittelmatrizes eine vollständige Inaktivierung von *C. jejuni* in püriertem Hühnerfleisch ab einem Druck von 400 mPa demonstrieren. Nach MARTINEZ-RODRIGUEZ und MACKKEY (2005) nimmt die Lebensmittelmatrix einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Effektivität der HPP-Behandlung.

Thermotolerante *Campylobacter* besitzen gegenüber ultravioletten als auch gegenüber ionisierenden Strahlen eine hohe Sensitivität. So stellten beispielsweise BUTLER et al. (1987) eine im Vergleich zu *Escherichia coli* höhere Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen fest. PATTERSON (1995) ermittelte D_{10} -Werte von 0,12 bis 0,25 kGy (Gammastrahlen) in Geflügelfleisch bei 4 °C. Aus den Untersuchungen wurde für *Campylobacter* spp. eine höhere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen im Vergleich zu *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* abgeleitet. JONES et al. (1990) stellten im Rahmen ihrer

Untersuchungen fest, dass bereits eine 15-minütige Bestrahlung mit direktem Sonnenlicht die *Campylobacter*-Population in einem Abwasserkanal inaktiviert.

Hinsichtlich der Sensibilität gegenüber Antibiotika sind starke Spezies- und Stamm-spezifische Unterschiede zu verzeichnen. Eine Übersicht über die aktuelle Verbreitung von Antibiotikaresistenzen und weiterführende Literatur findet sich bei SNELLING et al. (2005). Die gängigen, von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) empfohlenen Desinfektionsmittel sind bei sachgerechter Anwendung und Dosierung wirksam gegen *Campylobacter* spp..

Die Interaktion mit bzw. die Inkorporation in natürliche Biofilme ermöglicht den Erregern, über einen längeren Zeitraum bei Nährstoffarmut oder oxidativem Stress zu persistieren (ROLLINS und COLWELL, 1986; BUSWELL et al., 1998, TRACHOO et al., 2002). Zudem ist die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln durch den Schutz der Biofilmmatrix herabgesetzt (TRACHOO und FRANK, 2002). Neueren Untersuchungen zufolge besitzt *C. jejuni* die Fähigkeit, sich unter Bildung eines Biofilms an Oberflächen wie Edelstahl oder Kunststoff anzuheften und sich dort zu vermehren (JOSHUA et al., 2006; REESER et al., 2007).

Die stetig wachsende Inzidenz der humanen intestinalen Campylobacteriosen stehen in einem gewissen Widerspruch zu der vergleichsweise sehr geringen Tenazität der thermotoleranten *Campylobacter* und ihren speziellen Anforderungen an das Nährstoffangebot und die Wachstumsbedingungen (PARK, 2002; RKI, 2007). Offensichtlich bestimmen weitere Faktoren die Persistenz dieser Erreger in der Lebensmittelkette bzw. der Umwelt. Die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen (JOSHUA et al., 2006), die extreme genotypische und phänotypische Variabilität (PARKHILL et al., 2000; WASSENAAR und NEWELL, 2000; PETERSEN, 2001), der Übergang in kokkoide Zellformen (ROLLINS und COLWELL, 1986; MORAN und UPTON, 1987) sowie der reversible Übergang in ein „viable, but nonculturable“ (VBNC)-Stadium (JONES et al., 1991) könnten entscheidende Überlebensmechanismen darstellen (PARK, 2002; MURPHY et al., 2006).

Von grundlegender Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit und für die quantitative mikrobiologische Risikoschätzung ist das Vorhandensein von signifikanten Stamm-spezifischen Unterschieden hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen (DOYLE und ROMAN, 1982a,b; TERZIEWA und MCPETERS, 1991; JONES et al., 1993; PATTERSON, 1995; BUSWELL et al., 1998; MOORE und MADDEN, 2000; CHAN et al., 2001; CHAVEERACH, 2003; MARTINEZ-RODRIGUEZ und MACKAY, 2005; KAAKOUSH et al., 2007).

2.3 Campylobacteriose des Menschen

Die humane Campylobacteriose ist eine überwiegend lebensmittelassoziierte Zoonose. Innerhalb des Genus *Campylobacter* zählen die meisten Spezies zu den für Mensch und Tier pathogenen Arten, wobei *C. jejuni* für die weitaus meisten gemeldeten Fälle humaner *Campylobacter*-Infektionen verantwortlich zeichnet. Das Robert Koch-Institut (RKI) erfasst seit Inkrafttreten des Gesetzes zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz, IfSG) am 1. Januar 2001 die durch *Campylobacter* spp. verursachten Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland. Im Jahr 2007 entfielen bis zur 26. Meldewoche 89,8 % der *Campylobacter*-Erkrankungsfälle auf die Spezies *C. jejuni*, 8,0 % auf *C. coli* und 1,6 % auf *C. lari* (RKI, 2007).

In den Jahren 2005 und 2007 überstieg die Zahl der in der Bundesrepublik Deutschland durch *Campylobacter* spp. verursachten Gastroenteritiden die Zahl der Salmonellosen. Die bundesweite Inzidenz betrug im Median der Jahre 2001-2004 66,9 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Sie unterliegt einer regionalen und geschlechtsspezifischen Verteilung. Darüber hinaus zeigt sie einen saisonalen Verlauf mit einem

Plateau zwischen der 23. und 37. Meldewoche. Der ausgeprägte Sommergipfel belegt, dass die Inzidenz der Infektion unter anderem von der Temperatur und den klimatischen Gegebenheiten abhängt. Alle Al-

tersklassen sind von Erkrankungen durch *Campylobacter* spp. betroffen, wobei zwei Erkrankungsgipfel, bei Kindern unter 4 Jahren und bei jungen Erwachsenen (15-39 Jahre), zu beobachten sind (RKI, 2006b; RKI, 2007).

Die Kenntnis von **Pathogenitäts- und Virulenzmerkmalen** ist für die Beurteilung einer Gesundheitgefährdung durch *Campylobacter* spp. von grundlegender Bedeutung. Bislang liegen nur wenige gesicherte Erkenntnisse über die Pathogenitätsmechanismen vor. Neben Pathogenitätsmerkmalen wie der chemotaktisch gesteuerten Motilität, der Bildung von Toxinen sowie der Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion, scheinen nach den bisherigen Erkenntnissen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen. Zu diesen Einflussgrößen gehören die Variabilität der Oberflächenantigene, die Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Stressoren, der Erwerb und die Verwertung von extrazellulärem Eisen sowie das intrazelluläre Überleben in Makrophagen und Monozyten (KONKEL et al., 2001; KIST, 2002; PARK, 2002; SNELLING et al., 2005).

Die Mechanismen, mit denen *Campylobacter* spp. eine Erkrankung induzieren, sind noch nicht vollständig verstanden. Auf der Basis experimenteller Ergebnisse wurde das folgende Modell postuliert, das sich in drei Schritte unterteilen läßt (KONKEL et al., 2001):

- a) Intestinale Kolonisation und Bildung von Enterotoxinen
- b) Invasion und Vermehrung in den Zellen der intestinalen Mucosa mit nachfolgender Nekrose der Darmvili
- c) Überwindung der Darmschranke und Ausbreitung im Wirtsorganismus (nur bei extraintestinalen Krankheitsverläufen).

Die chemotaktisch gesteuerte Motilität bildet eine wichtige Voraussetzung für die Kolonisation der Darmschleimhaut. Thermotolerante *Campylobacter* sind aufgrund ihrer Flagellen und ihrer spiraligen Form in der Lage, die visköse Muzinschicht des Darmes zu durchdringen und die Darmschleimhaut zu besiedeln. Bestandteile der Muzinschicht, wie L-Serin, L-Fucose und Muzine, wirken dabei positiv chemotaktisch (KONKEL et al., 2001). Nach BEERY et al. (1988) nutzt *C. jejuni* die Muzine der Darmschleimhaut als Energiequelle.

C. jejuni-Stämme sind zur Bildung des Zytotoxins „cytolethal distending toxin“ (CDT) befähigt (PICKETT et al., 1996; PARK, 2000). Im Zellkulturmodell hemmt es eukaryotische Zellen vermutlich in der Phase G2 ihres Zellzyklus (WHITEHOUSE et al., 1998). In-vivo könnte dieser Effekt - eine vergleichbare Aktivität vorausgesetzt - zum Funktionsverlust bis hin zur Erosion der Epithelzellen der intestinalen Mukosa und damit einhergehender Diarrhoe führen (PURDY et al., 2000; PARK, 2002). Auch für einige Stämme CDT-negativer Mutanten ließ sich im Zellkulturmodell eine toxische Aktivität beweisen (PICKETT et al., 1996; PURDY et al., 2000), so dass von der Existenz weiterer Toxine in einigen *C. jejuni*-Stämmen ausgegangen werden kann (PARK, 2002). Für *C. jejuni* wurden weitere Toxine (Entero- und Zytotoxine) beschrieben, deren Bedeutung für die Erkrankung allerdings noch ungeklärt ist (WASSENAAR, 1997; HÄNEL et al., 1998; LEE et al., 2000).

Die Fähigkeit zur Zelladhäsion und -invasion sind weitere Eigenschaften, die mit der Pathogenität von *C. jejuni*-Stämmen korrelieren. Für *C. jejuni* wurden mehrere Adhäsine, wie „outer membrane proteins“ (omps), das Flagellum, Lipopolysaccharide (LPS) sowie peritriche Haar-ähnliche Membranfortsätze postuliert. Die Membranproteine PEB₁, PEB₃ und CadF sind gut charakterisiert. CadF bindet an das Fibronektin der Wirtszellmembranen und ist bisher das einzige OMP, für das ein Oberflächenrezeptor auf eukaryotischen Zellen identifiziert werden konnte (KONKEL et al., 2001). Die Invasion in die Epithelzellen der intestinalen Mucosa gilt als ein Pathogenitätsmerkmal von *C. jejuni*. Der genaue Invasionsmechanismus ist unbekannt, scheint jedoch mit der Bildung von Mikrofilamenten (MF) und Mikrotubuli (MT) durch die intestinalen Epithelzellen assoziiert zu sein (KOPECKO et al., 2001; BISWAS et al., 2003). Anhand von Zellkulturstudien mit *flaB*-negativen Mutanten konnten WASSENAAR et al. (1991) demonstrieren, dass die *flaA*-basierte Motilität in-vitro einen wichtigen Beitrag zur Invasion menschlicher embryonaler Darm-

epithelzellen (INT-407) leistet. In-vitro ist die Invasivität von *C. jejuni* in Zellkulturen mit einer De-Novo-Synthese von mikrobiellen Proteinen (sogenannten „entry promoting proteins“) verbunden und erfordert eine wirtszelleigene Signaltransduktion (KONKEL et al., 2001).

Hinsichtlich der Virulenz besteht eine erhebliche Stamm-spezifische Diversität bis hin zur Apathogenität (EVEREST et al., 1992; PICKETT et al., 1996; HARVEY et al., 1999; PURDY et al., 2000; MÜLLER et al., 2006). HÄNEL und SCHULZE (1999) gelang die Identifizierung von Klonen, die sich durch die Kombination unterschiedlicher Virulenzmerkmale definierten und aus diesem Grund möglicherweise unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen aufwiesen. BACON et al. (2000) konnten in ihrer Studie darstellen, dass der Besitz von bestimmten Plasmiden bei einigen Stämmen mit einer gesteigerten Virulenz einherging. Die Annahme einer Stamm-abhängigen Virulenz deckt sich bis zu einem gewissen Grad mit den Erkenntnissen aus Untersuchungen, bei denen Isolate menschlicher und tierischer Herkunft mit molekularbiologischen Typisierungsmethoden verglichen wurden. Nur ein Teil der Genotypen, die in Tieren beobachtet werden, tritt auch beim Menschen auf, was die Existenz apathogener *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämme vermuten lässt (KOROLIK et al., 1995; HOPKINS et al., 2004; SIEMER et al., 2004). Bis zur Klärung der wesentlichen Pathogenitäts- und Virulenzmerkmale müssen allerdings sämtliche *Campylobacter* als potentiell humanpathogen eingestuft werden (BfR, 2005).

Im Gegensatz zu anderen Enteritiserregern wurden für *C. jejuni* relativ niedrige **minimale Infektionsdosen (MID)** beschrieben. ROBINSON (1981) konnte mit 500 Keimen, welche mit 180 ml Milch aufgenommen wurden, eine Erkrankung auslösen. Die niedrige MID könnte das Auftreten von Infektionen durch gering kontaminierte Lebensmittel erklären (MEDEMA et al., 1996). Im Zusammenhang mit Krankheitsausbrüchen wurden in den beteiligten Lebensmitteln verhältnismäßig geringe *Campylobacter*-Keimzahlen von bis zu 500 KfE pro Milliliter oder Gramm ermittelt (PEBODY et al., 1997).

Die Infektionsdosis wird von der „epidemiologischen Trias“, d.h. der Virulenz des Erregerstammes, der Art des Lebensmittels und durch die individuelle Empfindlichkeit des Konsumenten maßgeblich beeinflusst.

BLASER et al. (1980) vermuten auf der Basis von Ausbruchsuntersuchungen, dass die MID geringer ist, wenn puffernde Substanzen, wie z. B. Milch, aufgenommen werden. Verkeimtes Wasser bildet insoweit ein Risiko, als es den Keimen eine schnelle Magenpassage ermöglicht. Für Salmonellen konnte beim Verzehr von kontaminierter Schokolade eine um vier \log_{10} -Stufen geringere MID nachgewiesen werden, da sich der hohe Fettgehalt der Schokolade während der Magenpassage protektiv auswirkte (HARRIGAN, 1998).

Für Kleinkinder, Senioren über 65 Jahre, Schwangere und immunsupprimierte Personen (sogenannte YOPIs: „young, old, pregnant, and immuno-compromised“) ist eine deutlich höhere Empfindlichkeit zu unterstellen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die MID für diese Risikogruppen deutlich unter 500 Keimen liegen kann. Nach allgemeinen Schätzungen werden in Deutschland bis zu 30 % der Bevölkerung derartigen Risikogruppen zugerechnet (BfR, 2005). Erwachsene und regelmäßige Rohmilchkonsumenten scheinen ein deutlich geringeres Risiko zu haben, symptomatisch an einer *Campylobacter*-Infektion zu erkranken, was auf eine „stille Feiung“ durch die wiederholte Aufnahme geringer Keimmenge hinweisen könnte. Der Erwerb einer protektiven Immunität wird auch als Ursache für die Streuung der individuellen Befallsraten („attack rates“) im Rahmen von *Campylobacter*-Ausbrüchen diskutiert (BLASER et al., 1987; THOMAS et al., 1999).

Eine Gefahr wird allgemein durch eine Dosis-Wirkungsbeziehung und die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung nach Aufnahme einer definierten Keimmenge charakterisiert (FAO/WHO, 2003). BLACK et al. (1988) ermittelten mit jungen gesunden Probanden für zwei *C. jejuni*-Stämme Daten zur Dosis-Wirkungsbeziehung. Nach Verabreichung der niedrigsten Keimmenge (800 Keime *C. jejuni*-Stamm A3249) infizierten sich 5 von 10 Freiwilligen und eine infizierte Person erkrankte. Für *Campylobacter* fehlen bis heute ausreichende Informationen zur Modellierung einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Es mangelt insbe-

sondere an experimentellen Resultaten zur Wirkung von kleinen Mengen des Pathogens (MEDEMA et al., 1996; BfR, 2005).

Die **klinischen Manifestationen** der Campylobacteriose sind ausgesprochen vielgestaltig. Neben sehr seltenen Fällen einer Sepsis mit Todesfolge, insbesondere bei Senioren und immunsupprimierten Patienten, verlaufen viele Infektionen asymptomatisch. Der aktuelle Therapieansatz findet sich bei RKI (2005).

Die akute Enterokolitis stellt die weitaus häufigste klinische Verlaufsform der Campylobacterinfektion dar. Nach einer Inkubationszeit von 2 - 5 Tagen, in Einzelfällen auch bis zu 10 Tagen, setzt ein in der Regel wenige Stunden dauerndes Prodromalstadium mit Fieber (38 - 40 °C) sowie Kopf- und Muskelschmerzen ein. Anschließend entwickeln sich als Hauptsymptome profuse wässrige, z.T. auch blutige Durchfälle sowie krampfartige abdominale Schmerzen, die von Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit und (selten) Übelkeit bzw. Erbrechen begleitet sein können (BUTZLER und OOSTEROM, 1991). Hinsichtlich der Häufigkeit der klinischen Symptome bei Enteritisausbrüchen gibt es unterschiedliche Angaben, wie Tab. 4 ausweist. Bei komplikationsfreiem Verlauf tritt nach durchschnittlich 5 - 7 Krankheitstagen eine klinische Spontanheilung ein. Der Erreger wird häufig noch zwei bis drei Wochen im Stuhl ausgeschieden. Rezidive, insbesondere länger anhaltende Schmerzen im Abdominalbereich, treten bei 5 - 10 % der unbehandelten Patienten auf (PEARSON und HEALING, 1992; KIST, 1996; RKI, 2006b).

Tab. 4: Relative Häufigkeit klinischer Leitsymptome im Zusammenhang mit Häufungen (in %)

Durchfall	Bauchkrämpfe	Fieber	Kopfschmerzen	Übelkeit	Erbrechen	blutiger Stuhl	Literatur
100	91	65		56	31	13	FAHEY et al. (1995)
91	96	70			43	26	EVANS et al. (1996)
93		55				16	RKI (1997)
92	100	83	100				EVANS et al. (1998)
82	100	73		73			RKI (1999)
89	95	74	80		32		RKI (2000a)
93	92	76			40	23	CDC (2002)
94	84	31		63	49		GALLAY et al. (2006)

89 - 93 % der Campylobacteriosen des Menschen werden durch *C. jejuni* verursacht. *C. coli* steht mit 7 - 10 % an zweiter Stelle, während *C. lari* und andere *Campylobacter*-Spezies nur in Einzelfällen als Erreger isoliert wurden (PEARSON und HEALING, 1992; EFSA, 2005, 2006). Die Wahrnehmung der klinischen Signifikanz thermotoleranter *Campylobacter* spp. und insbesondere von *C. jejuni* wird zu einem nicht unerheblichen Anteil durch die Isolierungsmethodik beeinflusst. Möglicherweise führt die hohe Spezifität klinischer Isolierungsprotokolle hinsichtlich der Spezies *C. jejuni* zu einer fälschlicherweise zu geringen Nachweishäufigkeit anderer Spezies innerhalb der Gattung (BOLTON et al., 1987). Zudem fehlen häufig bei den nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) gemeldeten Daten Angaben zur Spezies der klinischen Isolate, da eine Arten-Differenzierung häufig routinemäßig nicht durchgeführt wird (PEBODY et al., 1997; RKI, 2006b). Eine Übersicht über die klinische Signifikanz anderer Spezies als *C. jejuni* und *C. coli* findet sich bei LASTOVICA und SKIRROW (2000).

Komplikationen und Folgekrankheiten der *Campylobacter*-Enteritis sind selten, dann jedoch sehr ernst (SMITH, 1995; CRUSHELL et al., 2004). Als akute Komplikationen kommen unter anderem schwer verlaufende Kolitiden, Appendicitiden, Cholezystitiden, Pankreatitiden und Hepatitiden vor. Untersuchungen von SKIRROW et al. (1993) zufolge tritt bei 0,15 % aller *Campylobacter*-Enteritiden eine Bakteriämie auf. Obwohl sie gewöhnlich nur eine vorübergehende Komplikation der Gastroenteritis darstellt, kann die Bakteriämie bei den Risikogruppen zu ernsthaften Erkrankungen führen. Betroffen sind insbesondere

ältere (> 65 Jahre) und immunsupprimierte Patienten (Chemotherapie, Diabetes, HIV, Transplantation) (PIGRAU et al., 1997; TEE und MIJCH, 1998). Die Häufigkeit einer Bakteriämie wird wahrscheinlich methodisch bedingt unterschätzt (JENKS et al., 1997).

In etwa 1 % der Enteritisfälle wird ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn eine reaktive Arthritis beobachtet. Das als Reiter-Syndrom benannte klinische Vollbild der reaktiven Arthritis mit den vier Hauptsymptomen Arthritis, Konjunktivitis, Urethritis und Dermatitis bildet sich in etwa 20 % dieser Fälle aus (PETERSON, 1994; SMITH, 1995). Ferner können Aborte (DENTON und CLARKE, 1992; MEYER et al., 1997), akute Enzephalopathien (VAN DER KRUIJK et al., 1994), Pericarditiden und Myocarditiden (UZOIGWE, 2005), rheumatische Erscheinungen (PETERSON, 1994) und eine seltene Variante der Polyneuritis, das sogenannte Miller-Fischer-Syndrom (MFS) (ROBERTS et al., 1987; WILLISON et al., 1999) auftreten.

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) besitzt aufgrund des potenziell lebensbedrohlichen Verlaufs und der möglichen Spätfolgen die größte medizinische Bedeutung unter den Folgekrankheiten. In bis zu 40 % der Fälle geht dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome eine *Campylobacter*-Enteritis voraus. Schätzungen zufolge entwickelt sich bei jeder 1000. *Campylobacteriose* ein Guillain-Barré-Syndrom als Spätfolge. Das GBS ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine schwere, akut demyelinisierende Paralyse peripherer Nerven gekennzeichnet ist. Häufig treten zusätzlich sensorische Ausfälle auf. Die oberen Extremitäten und die Gehirnnerven sind in wechselnder Intensität betroffen, so dass sich relativ kurzfristig eine respiratorische Insuffizienz mit Beatmungspflicht entwickeln kann. Bis zur vollständigen Restitution vergehen Wochen bis Monate. Die Mortalitätsrate wird mit 2 - 3 % angegeben (MOLNAR et al., 1982; HUGHES et al., 1999). Es existieren Hinweise, dass bestimmte Serotypen von *C. jejuni* an der Entstehung des GBS vermehrt beteiligt sind (NACHAMKIN et al., 1998; NACHAMKIN, 2002; TAKAHASHI et al., 2005). Andere Autoren fanden dagegen keine signifikante Häufung von bestimmten Serovaren (ENDTZ et al., 2000).

2.4 Epidemiologie der humanen *Campylobacteriose*

2.4.1 Indirekte Übertragung

Die große Mehrzahl aller humanen *Campylobacter*-Enteritiden (97 - 99 %) äußert sich in Form von **sporadischen Erkrankungsfällen** (ADAK et al., 1995; BEAN et al., 1996; RKI, 2007), wobei mit einer nicht unerheblichen Dunkelziffer durch nicht gemeldete Fälle gerechnet werden muss (NACMCF, 1994; RKI, 2006b). Bei den registrierten Fällen gelingt häufig nicht der lückenlose Schluss der Infektkette, da entweder die verdächtigen Vektoren für eine mikrobiologische Untersuchung nicht mehr zur Verfügung stehen oder der gemeinsame klonale Ursprung der Isolate nicht zweifelsfrei belegt werden kann (THURM et al., 1999).

In den vergangenen Jahrzehnten wurde weltweit eine Reihe von kontrollierten Fallstudien durchgeführt, um die Ursachen sporadischer Erkrankungen, ihre relative Bedeutung sowie risikoreiche Haushaltspraktiken des Verbrauchers zu identifizieren. Nach einer amerikanischen Erhebung, bei der die Daten mehrerer Überwachungssysteme ausgewertet wurden, sollen bei 80 % aller *Campylobacter*-Infektionen Lebensmittel als Vektoren für die indirekte Übertragung der Erreger verantwortlich sein (MEAD et al., 1999). Die *Campylobacteriose* ist demnach eine lebensmittelassoziierte Zooanthroponose.

Der Umgang mit rohem Geflügelfleisch sowie der Verzehr von unzureichend erhitztem Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen wurden in zahlreichen epidemiologischen Studien als Hauptrisikofaktoren für eine Erkrankung identifiziert (HOPKINS und SCOTT, 1983; HARRIS et al., 1986; KAPPERUD et al., 1992; ALTEKRUSE et al., 1994; IKRAM et al., 1994; SCHORR et al., 1994; STUDAHL und ANDERSON, 2000; KAPPERUD et al., 2003; NEIMANN et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2004; WINGSTRAND et al., 2006). Etwa 47 % der in Deutschland auftretenden *Campylobacteriosen* können den Ergebnissen einer quantitativen

Risikoschätzung zufolge auf Hähnchenfleisch zurückgeführt werden. Die größte Gefahr geht dabei von frischem Hähnchenfleisch mit Haut aus. Dagegen verursachen tiefgefrorene Erzeugnisse kaum Erkrankungen. Weiter stellte sich heraus, dass dem Verzehr von unzureichend gegartem Hähnchenfleisch nur eine untergeordnete ätiologische Bedeutung zukommt. Dagegen spielen die Küchenhygiene und die persönliche Hygiene im Privathaushalt eine zentrale Rolle bei der Übertragung lebensmittelassoziierter Gastroenteritiden (BfR, 2005, 2006a). Studien aus den Niederlanden, Spanien und Italien zufolge entstehen 50 - 80 % der *Campylobacteriosen* im häuslichen Umfeld (BLOOMFIELD, 2003). Im Privathaushalt kann es durch kontaminierte Messer und Schneidbretter, die nach der Bearbeitung von rohem Hähnchenfleisch ungereinigt weiterverwendet werden, aber auch durch unzureichende Händehygiene zu einer Kreuzkontamination verzehrsfertiger Lebensmittel kommen (DEMING et al., 1987; DE BOER und HAHNE, 1990; COGAN et al., 1999; GORMAN et al., 2002). Äußerlich mit *Campylobacter* kontaminierte Verpackungen, insbesondere von rohem Geflügelfleisch, stellen in der Küche eine zusätzliche Quelle für Kreuzkontaminationen dar (HARRISON et al., 2001; JØRGENSEN et al., 2002; BURGESS et al., 2005). Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Quantifizierung der Keimstreuung innerhalb der Küche, um die von Kreuzkontaminationen ausgehenden Risiken genauer bewerten zu können (ZHAO et al., 1998; CHEN et al., 2001; COGAN et al., 2002; LUBER et al., 2005, 2006; LINDQVIST und LINDBLAD, 2008).

Die kausale Rolle von Rohmilch (SCHORR et al., 1994; STUDAHL und ANDERSON, 2000; SCHÖNBERG-NORIO et al., 2004) und unzureichend erhitztem Schweinefleisch und Schweinefleischerzeugnissen, wie beispielsweise Schweinekotelett und Schweinelende (STUDAHL und ANDERSON, 2000), Pâté (GILLESPIE et al., 2002) sowie Grillfleisch und Grillwürsten (KAPPERUD et al., 1992; ADAK et al., 1995; STUDAHL und ANDERSON, 2000) als weitere bedeutende alimentäre Risikofaktoren konnte gesichert werden.

Kontaminiertes Oberflächenwasser, welches beim Schwimmen oder beim Trinken aus Flüssen, Bächen und Quellen aufgenommen wird, sowie unzureichend desinfiziertes Trinkwasser, meist aus Eigenwasserversorgungsanlagen, sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden (KAPPERUD et al., 1992; ADAK et al., 1995; ROSEF et al., 2001; KAPPERUD et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2004; SCHÖNBERG-NORIO et al., 2004). In einigen Ländern scheint in Flaschen abgefülltes Wasser einen Risikofaktor darzustellen. Informationen zur Qualität des Flaschenwassers (Quell- oder Mineralwasser, kohlenensäurehaltig oder still) wurden allerdings nicht veröffentlicht (GILLESPIE et al., 2002; EVANS et al., 2003; SCHÖNBERG-NORIO et al., 2004).

Auslandsreisen sind unabhängig von der Infektionsquelle ein bedeutender Risikofaktor. Durchschnittlich 9 % aller im Zeitraum von 2001 bis 2006 dem Robert Koch-Institut gemeldeten *Campylobacteriosen* standen mit Auslandsreisen, vornehmlich nach Nordafrika und Asien, im Zusammenhang (RKI, 2007). Thermotolerante *Campylobacter* sind bei Aufenthalten in Südeuropa, Afrika und Asien neben Enterotoxin-bildenden *Escherichia coli* (ETEC) die häufigsten Erreger der Reisediarrhoe (SCHORR et al., 1994; REINTHALER et al., 1998; LÖSCHER und HOELSCHER, 2002).

Die Rolle von Insekten, insbesondere der Hausfliege (*Musca domestica*) und Schaben (*Blatta orientalis* und *Periplaneta americana*), als Vektoren für thermotolerante *Campylobacter* wurde früh postuliert (ROSEF und KAPPERUD, 1983; UMUNNABUIKE und IROKANULO, 1986). Neueren Studien zufolge kommt der Hausfliege eine entscheidende Rolle bei der Durchseuchung von Tierbeständen zu. Zudem könnte sie eine bedeutende, bisher wenig beachtete Rekontaminationsquelle für verzehrsfertige Lebensmittel in Küchen darstellen (HALD et al., 2004; NICHOLS, 2005).

Im Jahr 2005 betrug der Anteil der dem Robert Koch-Institut gemeldeten Erkrankungen, die im Rahmen von **Häufungen (Krankheitsausbrüche)** auftraten, 3 %. Insgesamt wurden 758 Ausbrüche mit 2010 Erkrankungen übermittelt. Milch, Wasser und Geflügelfleisch sind vielfach als alimentäre Hauptvektoren für Häufungen beschrieben worden (EVANS et al., 1996; EVANS et al., 1998; RKI, 1999; THURM et al., 1999; THURM et al., 2000; CDC, 2002; ALLERBERGER et al., 2003; MAZICK et al., 2006). Von 16 in den Jahren 1992 bis 1994 in England und Wales verzeichneten *Campylobacter*-Ausbrüchen mit bekannter

Ätiologie konnten 38 % dem Vektor Wasser und 31 % dem Vektor Milch, insbesondere Rohmilch (19 %) zugeordnet werden. Lediglich zwei Ausbrüche (13 %) ließen sich ätiologisch auf Geflügelfleisch zurückführen (PEBODY et al., 1997).

Wasser ist nicht nur für sporadische Fälle verantwortlich, es bildet weltweit die bedeutendste Ursache für *Campylobacter*-Ausbrüche. Kontaminiertes Oberflächenwasser und unzureichend desinfiziertes Wasser aus Einzelwasserversorgungen wurden wiederholt als Vektoren genannt (KOENRAAD et al., 1997; PEBODY et al., 1997; THURM und DINGER, 1998; THOMAS et al., 1999). Derartige Ausbrüche sind nicht selten durch eine sehr hohe Zahl von Erkrankten gekennzeichnet (MELBY et al., 1991; JONES und ROWORTH, 1996; MELBY et al., 2000). In zentralen Wasserversorgungen konnten bisher keine thermotoleranten *Campylobacter* nachgewiesen werden. Fäkale Einträge von *Campylobacter* aus Nutztierbeständen in das Grundwasser stellen in diesem Kontext ein Risiko dar (STANLEY et al., 1998; GALLAY et al., 2006).

Zwischen 1991 und 1997 wurden vom BgVV siebzehn durch *C. jejuni* bedingte Häufungen mit insgesamt 940 Erkrankten näher untersucht. Dabei stellte sich Rohmilch mit allein 11 Häufungen (65 %) und annähernd 800 Erkrankten als der mit Abstand wichtigste Vektor heraus (THURM und DINGER, 1998). Vor allem Kinder, insbesondere im Vorschulalter, scheinen von milchassoziierten Ausbrüchen betroffen zu sein (BLASER et al., 1987; WOOD et al., 1992; RKI, 1997; RKI, 2000a; RKI, 2000b; CDC, 2002; RKI, 2006a). Auch fehlerhaft pasteurisierte Milch ist als Ursache von *Campylobacter*-Ausbrüchen beschrieben worden (BIRKHEAD et al., 1988; FAHEY et al., 1995). Die Milch wird in der Regel während des Melkvorganges fäkal kontaminiert. Nur in Einzelfällen kommt eine *Campylobacter*-Mastitis als Ursache für die Ausscheidung von *Campylobacter* über die Milch in Frage (MORGAN et al., 1985; ORR et al., 1995).

Es liegen bisher vergleichsweise wenige Berichte über Geflügelfleisch-assoziierte *Campylobacter*-Häufungen vor (BROWN et al., 1988; EVANS et al., 1998; KESSEL et al., 2001; ALLERBERGER et al., 2003; MAZICK et al., 2006).

2.4.2 Direkte Übertragung

Der Kontakt mit infizierten Haustieren (vorwiegend junge Hunde und Katzen) und Nutztieren (Geflügel, Rinder und Schweine) wurde als einer der wesentlichen Risikofaktoren für *Campylobacter*-Enteritiden identifiziert. Die relative Bedeutung von Kontaktinfektionen wurde anhand von sporadischen Erkrankungsfällen und Ausbrüchen (BLASER et al., 1983; DEMING et al., 1987; MILLER et al., 1987; SAEED et al., 1993) vielfach beschrieben und durch Fallkontrollstudien (KAPPERUD et al., 1992; STUDAHL und ANDERSON, 2000; KAPPERUD et al., 2003) gesichert. Durch vergleichende molekularbiologische Feintypisierung von Isolaten gelang WOLFS et al. (2001) erstmals der Nachweis einer direkten Übertragung einer *Campylobacter*-Infektion von einem Hundewelpen auf ein drei Monate altes Baby.

Epidemiologische Studien aus England und Schweden belegen, dass berufsbedingter Kontakt zu Nutztieren signifikant mit dem Auftreten sporadischer *Campylobacter*-Infektionen korreliert (ADAK et al., 1995; STUDAHL und ANDERSON, 2000). Insbesondere Milchbauern, Arbeiter in der Geflügelhaltung und -schlachtung sowie Mitarbeiter in Schlachthöfen sind einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt (HEALING et al., 1992).

Die direkte fäkal-orale Übertragung von Mensch-zu-Mensch (Kontakt-, Schmierinfektionen) spielt nach dem derzeitigen Kenntnisstand in der Epidemiologie der sporadischen *Campylobacter*-Infektion nur eine geringe Rolle (HEALING et al., 1992). Im Zusammenhang mit *Campylobacter*-Ausbrüchen wird allerdings häufig von Mensch-zu-Mensch-Übertragungen berichtet (RKI, 1999; CDC, 2002). Bemerkenswert ist hierbei, dass nicht selten weit mehr als 30 % der im Rahmen von Ausbrüchen bekannt gewordenen Infektionen über direkten Kontakt erworben werden (EVANS et al., 1996; RYAN et al., 1996; RKI, 1999). Kontaktinfektionen betreffen vor allem Kinder, insbesondere im Vorschulalter (JONES et al., 1981; BLASER et al., 1983; RKI, 1999; CDC, 2002).

Die vergleichende molekularbiologische Feintypisierung von menschlichen Isolaten mit Isolaten anderer Quellen brachte divergierende Ergebnisse. Eine Ursache liegt in der hohen Plastizität des *Campylobacter*-Genoms, welches durch häufige Rearrangierungen von Genen und einen horizontalen Genaustausch gekennzeichnet ist. *Campylobacter* spp. sind nur schwach klonal. Bereits eine Wirtspassage kann den Genotyp eines Isolates verändern, so dass es kaum möglich ist, ein Isolat eindeutig mit molekularbiologischen Feintypisierungsmethoden zu definieren und den Klon über die gesamte Infektkette zu verfolgen (WASSENAAR et al., 1998). Einige von Menschen, Tieren und aus dem Oberflächenwasser isolierte Stämme gehören möglicherweise identischen Klonen an. Daneben existieren auch scheinbar wirtsspezifische Klone. Nur ein Teil der menschlichen Isolate ließ sich auf die Quelle Geflügel zurückführen, so dass neben diesem Vektor weitere, bisher möglicherweise unterbewertete Quellen wahrscheinlich sind (NADEAU et al., 2002; HOPKINS et al., 2004; SIEMER et al., 2004). WIELAND et al. (2006) untersuchten im Rahmen einer Genotypisierungsstudie die epidemiologischen Verwandtschaftsbeziehungen menschlicher Isolate mit denen verschiedener anderer Quellen. Von den Human-Isolaten wiesen 27 %, 21 % bzw. 9 % einen hohen Übereinstimmungsgrad mit Geflügel-, Heimtier- und Rinderisolaten auf.

Der relative Beitrag der einzelnen Vektoren und anderer potentieller Quellen an der Inzidenz der humanen Campylobacteriose ist nach wie vor ungeklärt, und seine Ermittlung bedarf einer weiteren multidisziplinären Zusammenarbeit. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Risikofaktoren für humane Campylobacteriosen durch *C. coli* von denen durch *C. jejuni* unterscheiden könnten. Fallkontrollstudien als Instrumente der deskriptiven Epidemiologie werden in der Regel nicht auf Speziesniveau durchgeführt, so dass arttypische Unterschiede hinsichtlich der Risikofaktoren möglicherweise nicht erkannt werden (GILLESPIE et al., 2002).

2.4.3 Reservoirs und Übertragungswege

Der Gastrointestinaltrakt von warmblütigen Wild-, Zoo-, Nutz- und Heimtieren, wie Hunden und Katzen, bildet das **natürliche Habitat und Reservoir** für thermotolerante *Campylobacter*. Obwohl sie regelmäßig in hohen Konzentrationen in Fäzes nachgewiesen werden (JONES, 2001), lassen sich nur selten gleichzeitig Krankheitserscheinungen feststellen. Dies gilt besonders für Hunde- und Katzenwelpen, Lämmer und Kälber. Thermotolerante *Campylobacter* werden daher als intestinale Kommensalen betrachtet (ALTEKRUSE et al., 1994).

Wildlebende Vögel sowie Zucht- und Nutzgeflügel, insbesondere Puten, Enten und Hühner, werden als Hauptreservoir insbesondere für *C. jejuni* angesehen. Sein Wachstumsoptimum liegt zwischen 42 °C und 43 °C und ist damit bestens an die Körperkerntemperatur von Vögeln angepasst. Aus Geflügelkot wird *C. jejuni* regelmäßig in hohen Nachweisraten von bis zu 100 % isoliert. Dagegen wird in Schweinefäzes *C. coli* als dominierende Spezies nachgewiesen (CABRITA et al., 1992; PARK, 2002).

Neben dem Vorkommen im Darmtrakt vieler warmblütiger Tiere sind *Campylobacter* auch **in der Umwelt ubiquitär verbreitet**. Ihr Vorkommen bleibt hier aber eng an fäkale Ressourcen gebunden. Abbildung 2 (s. Seite 15) stellt die wichtigsten Vektoren und Transmissionswege dar. Eine Übersicht und weiterführende Literatur findet sich bei JONES (2001).

Tierdung, insbesondere von infizierten Rindern und Schweinen, sowie die organische Düngung stellen bisher wenig beachtete Glieder in den Infektionsketten dar. Verschiedene neuere Studien wiesen nach, dass mit dem Dung auf Böden ausgebrachte *Campylobacter* mehrere Wochen überleben können (BRANDL et al., 2004; NICHOLSEN et al., 2005). Über direkt oder indirekt kontaminiertes Gemüse, freilaufende Haustiere und eine Auswaschung in Badegewässer oder andere Oberflächengewässer erfolgt dann möglicherweise eine Weiterverbreitung (BfR, 2005).

Thermotolerante *Campylobacter* können regelmäßig und mit teilweise hohen Nachweisraten aus fäkal kontaminierten, ungechlorten Abwässern, aus Grundwasser, Flüssen, Seen und anderen Oberflächenge-

wässern sowie aus ufernahen Bodenproben isoliert werden (STANLEY et al., 1998; BOLTON et al., 1999; THOMAS et al., 1999; SCHINDLER et al., 2003; HÖRMAN et al., 2004). Die Prävalenz ist im Einzugsbereich von landwirtschaftlichen Betrieben oder Weideflächen am höchsten. Verschiedene Studien berichten von saisonalen Schwankungen der Nachweisraten mit einem Gipfel im Hochsommer (BRENNHOVD et al., 1991; KORHONEN und MARTIKAINEN, 1991; JONES, 2001; HÖRMAN et al., 2004).

Außerhalb ihrer ökologischen Nische, dem Gastrointestinaltrakt warmblütiger Tiere, werden thermotolerante *Campylobacter* mit einer Reihe von Stressoren, wie Nährstoffmangel, unzureichende Temperaturen, UV-Strahlung, antimikrobiellen Wirkstoffen und biologischen Interaktionen mit anderen Mikroorganismen konfrontiert. Unter diesen Bedingungen unterliegen die Keime einer physiologischen und morphologischen Transformation hin zu unbeweglichen, kokkoiden Formen mit geringer metabolischer Aktivität. ROLLINS und COLWELL (1986) bezeichneten dieses Stadium als „Viable, but non-culturable“ (VNC bzw. VBNC), da ihre Versuche, kokkoide Formen von *C. jejuni* mit den klassischen mikrobiologischen Methoden anzuzüchten, wiederholt scheiterten. Es handelt sich bei der kokkoiden Transformation wahrscheinlich um einen passiven, von der DNA-Replikation und der Proteinbiosynthese unabhängigen Prozess (THOMAS et al., 1999).

Die Vitalität und Virulenz der VBNC-Formen konnten bisher nicht endgültig belegt werden. Einige Autoren sehen die VBNC-Form als eine degenerative Vorstufe hin zum Zelltod an, während andere sie als ein „Schlafstadium“ betrachten, mit dem die Bakterien ihr Überleben und ihre Persistenz in der Umwelt sichern. Studien anhand verschiedener In-vitro-Infektionsmodelle (HeLa-Zellkulturen, Spezifisch-Pathogen-freie(SPF)-bebrütete Hühnereier, -Küken und -Mäuse) führten zu divergierenden wissenschaftlichen Beurteilungen. Neben Stamm-spezifischen Unterschieden hinsichtlich der Pathogenität kommen als mögliche Ursachen dieser Divergenzen Einflüsse durch unterschiedliche Herstellungsmodalitäten der VBNC-Formen sowie durch die verschiedenen Infektionsmodelle in Betracht. Bei Tierversuchen können Einflüsse durch die komplexe Darmflora der Wirte nicht ausgeschlossen werden (THOMAS et al., 1999).

Die Bildung einer infektiösen VBNC-Form durch thermotolerante *Campylobacter* in aquatischen Ökosystemen und ihre Bedeutung für die Epidemiologie sind gleichfalls unklar (TALIBART et al., 2000; PARK, 2002; BAFFONE et al., 2006). Kontaminiertes Oberflächenwasser nimmt im *Campylobacter*-Infektionszyklus eine zentrale Rolle ein und fungiert nicht nur als Vektor für die *Campylobacter*-Enteritis des Menschen, sondern dient vor allem als Umweltreservoir und Reinfektionsquelle für Tiere (Abb. 2). Die genauen Infektionsrouten und der Anteil humanpathogener Stämme im Umweltreservoir sind nach wie vor unbekannt.

Die **Transmissionswege von *Campylobacter* aus der Umwelt in die Nutztierbestände und darüber hinaus bis in die Lebensmittelkette** sind komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Insbesondere Geflügelbestände weisen regelmäßig einen hohen Durchseuchungsgrad mit thermotoleranten *Campylobacter* auf. Bei der Untersuchung von Kloakentupferproben wurde eine Herdenprävalenz von bis zu 90 % ermittelt (NEWELL und FEARNLEY, 2003). Für Deutschland wurde im Zeitraum von Mai 2004 bis April 2005 eine Herdenprävalenz von 39,3 % nachgewiesen (BfR, 2006a).

In den Masthähnchenbeständen der gemäßigten Breiten wird eine Saisonalität hinsichtlich der Infektionsraten beobachtet, mit einem Gipfel in den Monaten Juli, August und September (BERNDTSON et al., 1992; WALLACE et al., 1997; WEDDERKOPP et al., 2001; PETERS et al., 2006; BfR, 2007). Im Rahmen des nationalen *Campylobacter*-Masthähnchenmonitorings (2004 bis 2005) wurden signifikant erhöhte Prävalenzen von *Campylobacter* in Masthähnchenbeständen in den Sommermonaten festgestellt (PETERS et al., 2006). Eine quantitative Trendanalyse für die Jahre 2002 bis 2005 ergab für den Verzehr von Geflügelfleisch, im Gegensatz zum Verzehr von Schweine- oder Rindfleisch, eine gute Korrelation zu der Saisonalität der menschlichen Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland (BfR, 2007). Die Ursachen für die jahreszeitlich schwankenden Nachweisraten in den Masthähnchenbeständen und in den Umweltreservoirs sind weitgehend ungeklärt. Analog zu der Situation bei den humanen *Campylobacter*-infektionen werden auch

hier temperaturabhängige Einflüsse vermutet (PATRICK et al., 2004).

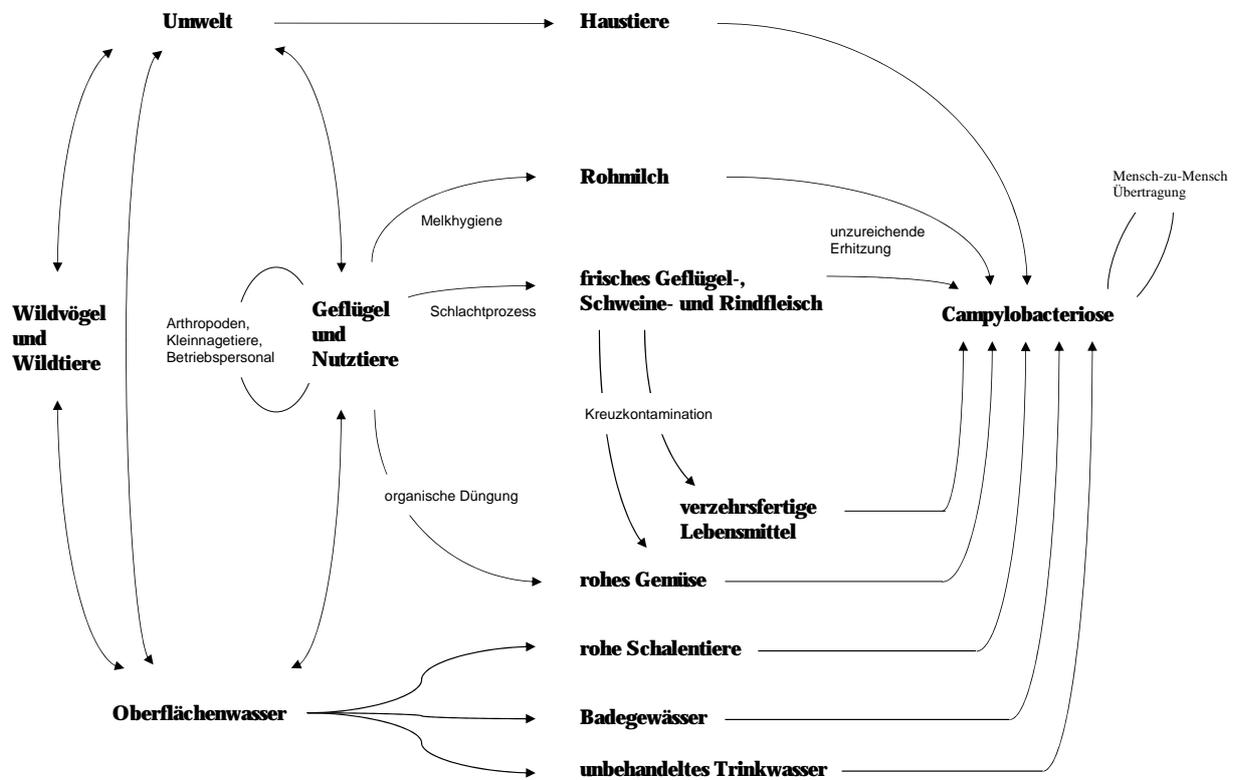


Abb. 2: Epidemiologie der humanen Campylobacteriose – Transmissionswege (modifiziert nach ALTEKRUSE et al., 1994)

Die Ursachen des Keimeintrages in Masthähnchenbestände wurden von NEWELL und FEARNLEY (2003) ausführlich referiert und mit zahlreichen Zitaten belegt. Eine vertikale Verbreitung über kontaminierte Eier wird kontrovers diskutiert. Sie dürfte aber insgesamt eine untergeordnete Rolle spielen, da sich eine Kolonisation mit *Campylobacter* in Masthähnchenherden frühestens in der zweiten Woche nach Aufstallung nachweisen lässt. Zudem ist die Empfänglichkeit für *Campylobacter* bei Küken am geringsten. Dem Keimeintrag und der Keimverschleppung auf horizontalem Weg über ungechlortes Tränkewasser, Aerosole und belebte Vektoren, wie Insekten, Nagetiere und Wildtiere, sowie durch eine unzureichende Reinigung und Desinfektion der Ställe kommt eine wesentlich größere Bedeutung zu. In seiner Bedeutung nicht zu unterschätzen ist auch die Einschleppung und Verbreitung von *Campylobacter* durch Besucher und das Betriebspersonal. Hände, Schuhe, Arbeitskleidung, Ausrüstungsgegenstände und Gerätschaften, die von außen mit in den Stall gebracht werden, sind häufig mit *Campylobacter* kontaminiert (NEWELL und FEARNLEY, 2003).

Innerhalb der Herde verbreitet sich *Campylobacter* durch direkte fäkal-orale Übertragung von Tier zu Tier sehr schnell, so dass in der Regel die gesamte Herde in kürzester Zeit kolonisiert ist. Es gibt Hinweise darauf, dass die Befallsrate innerhalb einer Herde mit zunehmendem Alter der Tiere sinkt und einzelne Tiere den Erreger intermittierend ausscheiden. *Campylobacter* lässt sich im Darmtrakt von Geflügel, insbesondere in Dickdarm, Blinddarm und Kloake, in hoher Konzentration nachweisen. Keimgehalte von $\log 5,0$ bis $\log 9,0$ KBE/g Darminhalt wurden ermittelt (CORRY und ATABAY, 2001).

Der Geflügelschlachtung kommt eine herausragende Bedeutung bei der Kontamination der Schlachtkör-

per und dem nachfolgenden Eintrag von *Campylobacter* in die Lebensmittelkette zu. Während der Elektrotäubung und beim Brühen werden die Karkassen schon am Anfang der Schlachtkette durch Defäkation massiv belastet. Durch den Brüh- und Rupfvorgang werden die Keime bis in das Unterhautbindegewebe einmassiert, gelangen mit dem Brühwasser in das perimuskuläre Bindegewebe und über die luftführenden Wege bis in die pneumatisierten Knochen. Das dortige mikroaerobe, feucht-warme Mikroklima fördert das Überleben der Kontaminationsflora. Im Zusammenhang mit der Eviszeration kommt es durch Darmrupturen zu einer weiteren oberflächlichen Kontamination der Karkassen. Der Prozess der Geflügelschlachtung führt letztendlich zu einer unvermeidlichen Keimverschleppung von infizierten Schlachtkörpern auf *Campylobacter*-freie Karkassen (FEHLHABER, 1992; CORRY und ATABAY, 2001; BERRANG et al., 2004).

Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnisse werden im Unterschied zu Rotfleisch im Handel häufig mit Haut angeboten. Der überwiegende Teil der Kontaminationsflora haftet unter Bildung eines Biofilms mehr oder weniger fest auf der Hautoberfläche. Durch Wasseraufnahme während des Schlachtprozesses quillt die Cutis auf und die Mikroorganismen werden in den Hautspalten eingeschlossen oder wandern aktiv in die Federfollikel oder Subcutis ein. Die Haut bietet insbesondere *Campylobacter* ein geeignetes Mikroklima, um über einen längeren Zeitraum bei dehydrierendem oder oxidativem Stress zu persistieren (LEE et al., 1998; DUFRENNE et al., 2001; CHANTARAPANONT et al., 2003). LEE et al. (1998) stellten hinsichtlich der Überlebensfähigkeit von *Campylobacter* deutliche Unterschiede bei Produkten mit und ohne Haut fest. UYTENDAELE et al. (1999) konnten *Campylobacter* spp. signifikant häufiger in Geflügelfleischproben mit Haut nachweisen.

Es ist davon auszugehen, dass 30 - 90 % der Karkassen am Ende des Schlachtprozesses mit *Campylobacter* kontaminiert sind. Im Rahmen verschiedener Studien wurden pro Karkasse *Campylobacter*-Gehalte von log 2,0 bis log 6,2 KbE ermittelt (CORRY und ATABAY, 2001). Gefrorene Schlachtkörper wiesen nach einer Untersuchung von DUFRENNE et al. (2001) eine um durchschnittlich 1-2 log₁₀-Stufen geringere *Campylobacter*-Zahl auf. Die Schwankungen hinsichtlich der Prävalenzen und der Keimzahlen sind auf unterschiedliche Prüfverfahren und auf verschiedene Probenmatrizes zurückzuführen (Spülprobe Karkasse, Spülprobe ½ Karkasse, Spülprobe Karkasse + Haut, 10 g oder 25 g Geflügelfleisch mit/ohne Haut, Hautpuffer, Auftauwasser, Hautprobe) (CORRY und ATABAY, 2001).

Obwohl Schweine- und Rinderbestände ebenfalls hohe *Campylobacter*-Befallsraten aufweisen, sind die Keime - im Gegensatz zu Geflügel - nach der Schlachtung und Trocknung im kühlen Luftzug nur mit geringen Prävalenzen im Fleisch nachweisbar. KWIASTEK et al. (1990) ermittelten bei der Untersuchung von Schweine- (n = 105) und Rinderschlachtkörpern (n = 114) mittels Tupferproben (100 cm²) Nachweisraten von 2,9 % bzw. 0,9 %.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *Campylobacter* durch sekundäre fäkale Kontamination während des Schlachtprozesses auf die Schlachtkörperoberfläche gelangen. Der Eintrag in Rohmilch erfolgt in der Regel beim Melken. **Lebensmittel tierischer Herkunft**, insbesondere rohes Hähnchen- bzw. Geflügelfleisch, sind daher primäre Risikofaktoren für eine *Campylobacter*-Enteritis (THURM und DINGER, 1998; JONES, 2001).

2.4.4 *Campylobacter*-Prävalenz bei Lebensmitteln im Einzelhandel

Die Prävalenz von *Campylobacter* in **frischem und tiefgefrorenem Geflügelfleisch**, insbesondere von Masthähnchen, ist hoch. Die Angaben in der Literatur schwanken stark, was möglicherweise auf unterschiedliche Verfahren des Probenverkehrs, abweichende Techniken der Probenvorbereitung (destruktiv, nicht-destruktiv, Probeneinwaage), die Zusammensetzung der Stichprobe (Art und Herkunft der Proben, jahreszeitliche Einflüsse) oder differierende Nachweisverfahren zurückzuführen ist. Ein Überblick über publizierte Prävalenzen findet sich bei SCHERER (2006).

In neueren Untersuchungen aus Deutschland werden für Hähnchenfleisch Prävalenzen von 38,3 % (ALTER et al., 2004) bis 87 % (LUBER und BARTELT, 2007) genannt.

LUBER und BARTELT (2007) ermittelten bei insgesamt 155 Hähnchenbrustfilets, die von Juni bis November 2004 im Berliner Einzelhandel erworben wurden, den *Campylobacter*-Keimgehalt mittels MPN-Verfahren (MPN = Most Probable Number). Auf der Grundlage der quantitativen Ergebnisse ergaben sich Prävalenzen von 87 % (87 von 100) auf der Oberfläche und 20 % (11 von 55) im Muskelgewebe. *C. jejuni* war die dominierende Spezies. *C. coli* wurde in 16,1 % der Spülproben und in 9,1 % der Muskelproben nachgewiesen.

SCHERER et al. (2006) untersuchten im Zeitraum von November 2003 bis Dezember 2004 insgesamt 90 Handelsproben frischer Hähnchenschenkel vergleichend mit zwei Probenahmetechniken (homogenisierte 25 g-Hautprobe, Spülprobe) qualitativ auf *Campylobacter* spp.. 70 % (63/90) der Hautproben und 77 % (69/90) der Spülproben erwiesen sich als *Campylobacter*-positiv. Für die Hautproben wurde eine Speziesverteilung von 84 % *C. jejuni* und 16 % *C. coli* berichtet. Im Rahmen derselben Studie wurde von 115 frischen Hähnchenschenkeln zusätzlich eine Muskelprobe von 10 g aus der Tiefe für eine Keimzahlbestimmung mit der MPN-Technik entnommen. Insgesamt konnten mit dem MPN-Verfahren in 31 der untersuchten Muskelproben (27 %) *Campylobacter* nachgewiesen werden. Es wurden in 97 % (30/31) *C. jejuni* und in einem Fall *C. coli* nachgewiesen.

Von Juni bis September 2003 ermittelten LUBER et al. (2005) bei 71 Hähnchenkeulen aus dem Berliner Einzelhandel die Prävalenz des Pathogens auf der Oberfläche und im Muskelinneren. 67,6 % (n = 48) der Tupferproben von der Oberfläche erwiesen sich als *Campylobacter*-positiv. Acht Hähnchenkeulen (11,3 %) waren zusätzlich im Muskelinneren kontaminiert.

In den Jahren 2001 bis 2003 wurden im Rahmen einer weiteren Studie mit Geflügelfleischproben aus dem Berliner Einzelhandel in 57,3 % der insgesamt 490 Proben mit einem an die ISO 10272:1995 (E) angelehnten Anreicherungsverfahren *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Im Einzelnen wurden die folgenden *Campylobacter*-Prävalenzen ermittelt: Geflügelfleisch 54,6 % (130/238), Geflügelinnereien 59,9 % (151/252), gefrorene Innereien 40,4 % (21/52), frische Innereien 65 % (130/200), Puteninnereien 56,8 % (46/81), Hähncheninnereien 61,4 % (105/171) und Leber 57,5 % (61/106). Die Nachweisrate bei frischen Produkten (n = 371) war mit 63,1 % signifikant höher als bei den gefrorenen Produkten (47/119). Von 342 untersuchten Proben der Tierart Hähnchen und 148 Proben der Tierart Pute erwiesen sich 58,8 % bzw. 54,1 % als *Campylobacter*-positiv (WERTH, 2006).

Bei einer Untersuchung von Hähnchenfleisch aus dem Berliner Einzelhandel im Zeitraum Oktober 2001 bis April 2002 zeigten sich 58,1 % der Proben mit *Campylobacter* spp. kontaminiert (LUBER, 2004).

ALTER et al. (2004) untersuchten im Rahmen einer Prävalenzstudie 419 frische Putenfleischproben, 75 Roh- und Brühwürste aus Putenfleisch und 198 frische Hähnchenfleischproben aus dem deutschen Einzelhandel. Die Autoren verwendeten ein Anreicherungsverfahren mit aerober Inkubation. Folgende Nachweisraten wurden ermittelt: Putenfleisch 6,2 %, Putenleber 16,0 %, Hähnchenfleisch 38,3 % (51/133) und Hähnchenlebern 23,1 %. Alle Putenwürste erwiesen sich als *Campylobacter*-negativ. Die Untersuchung von 65 Tupferproben von Hähnchenbrüsten erbrachte im Vergleich zum destruktiven Probenahmeverfahren eine deutlich niedrigere Prävalenz von 13,8 %, so dass die Autoren die Verwendung von Tupferproben zum *Campylobacter*-Nachweis aus Hähnchenfleisch als unzureichend bewerteten. Hinsichtlich der Speziesprävalenz dominierte *C. jejuni* mit 91,7 % im Hähnchenfleisch und 76,9 % im Putenfleisch.

Bei der Untersuchung ganzer Hähnchen aus dem Schweizer Handel stellten LEDERGERBER et al. (2003) bei gefrorenen Hähnchen eine signifikant geringere Prävalenz als bei frischen Produkten fest (7,9 % gegenüber 25,1 %).

Eine zweijährige Erhebung in der Schweiz zeigte, dass 62,5 % (40/64) der frischen und gefrorenen Ge-

flügelfleischproben und 63,2 % (12/19) der frischen und gefrorenen Geflügellebern mit *Campylobacter* belastet waren (SVOBODA et al., 2002).

Im Rahmen einer anderen Studie aus der Schweiz untersuchten BAUMGARTNER et al. (1995) 139 frische und 144 tiefgefrorene Hühnerlebern. Dabei erwiesen sich 31 % der frischen und 16 % der gefrorenen Proben als kontaminiert. 2,2 % der frischen Lebern enthielten mehr als 1000 *Campylobacter* pro Gramm. Die Autoren konnten weiter zeigen, dass die Kontamination größtenteils nicht nur oberflächlicher Natur war.

In einer irischen Studie wurden bei frischen Geflügelfleischproben aus dem Einzelhandel *Campylobacter*-Prävalenzen von 37,5 % (33/88) für Puten- und 49,9 % (444/890) für Hähnchenfleisch ermittelt (WHYTE et al., 2004). Erhebungen im spanischen Einzelhandel ergaben für Hähnchenfleisch eine vergleichbare Prävalenz von 49,5 % (98/198) (DOMÍNGUEZ et al., 2002).

Frisches Lamm-, Schweine- und Rindfleisch und daraus hergestellte Erzeugnisse weisen vergleichsweise geringe Prävalenzen im Einzelhandel auf (Tabelle 5, s. Seite 20). Eine irische Studie ermittelte im Zeitraum von März 2001 bis Oktober 2002 für Lammfleisch (n = 262), Schweinefleisch (n = 197) und Rindfleisch (n = 221) *Campylobacter*-Prävalenzen von 11,8 %, 5,1 % und 3,2 % (WHYTE et al., 2004). PEZZOTTI et al. (2003) konnten in Norditalien im Zeitraum von 2000 bis 2001 aus 10,3 % der Schweinefleischproben und aus 1,3 % der Rindfleischproben *Campylobacter* isolieren. Im Rahmen einer Schweizer Erhebung führten SVOBODA et al. (2002) in zwei von 40 rohen Schweinefleischproben einen positiven Nachweis. In Deutschland wurden im Zeitraum 2002 bis 2005 für Schweinefleisch Nachweisraten von 0,5 - 2,7 % ermittelt. Rindfleisch (n = 47) wies im Jahr 2005 eine *Campylobacter*-Prävalenz von 2,1 % auf (EFSA, 2006).

Die Untersuchungen von KRAMER et al. (2000) im Vereinigten Königreich zeigen, dass Innereien, wie Lamm- (72,9 %), Schweine- (71,7 %) und Ochsenlebern (54,2 %), deutlich häufiger mit *Campylobacter* belastet sind. Diese Befunde lassen sich wahrscheinlich auf Kontaminationen beim Schlachtprozess und -technisch bedingt- bei der Fleischuntersuchung zurückführen. Bei den Isolaten aus Rindfleisch bildeten mit 49,0 % *C. jejuni* und bei Schweinefleisch *C. coli* (42,2 %) die dominierende Spezies.

Campylobacter-Nachweise gelingen auch bei **anderen rohen und unverarbeiteten Lebensmitteln** tierischer Herkunft, wie Krusten- und Schalentieren (REINHARD et al., 1995; WILSON und MOORE, 1996; ENDTZ et al., 1997; FEDERIGHI et al., 1999; WHYTE et al., 2004). Belgien meldete für die Jahre 2004 und 2005 für lebende Muscheln *Campylobacter*-Prävalenzen von 16,7 % und 11,2 % (EFSA, 2005, 2006). Für Rohmilchsammelproben wurden Nachweisraten zwischen 1,4 % und 9,2 % berichtet. Mit wenigen Ausnahmen ist die Kontamination der Milch fäkalen Ursprungs (KIST, 2002). Vereinzelt wurden Nachweise in Vorzugsmilch (0,7 %) und (Roh)milch ab Hof (1,5 %) mitgeteilt (BfR, 2006b).

In Westeuropa und Nordamerika stellen *Campylobacter*-Nachweise bei **Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft** und in **verzehrfertigen Lebensmitteln** seltene und unregelmäßige Einzelbefunde dar. So konnte *C. jejuni* bislang aus frischem Marktgemüse (1,7 %) (PARK und SANDERS, 1992), aus rohen Pilzen (1,5 % bzw. 0,9 %) (DOYLE und SCHOENI, 1986; WHYTE et al., 2004), aus zerkleinertem Gemüse (1,3 %) (FEDERIGHI et al., 1999), aus Paté (0,8%) (WHYTE et al., 2004) und aus aufgeschnittenen Fleischerzeugnissen („cold ready-to-eat sliced meat“) (0,04 %) (ELSON et al., 2004) isoliert werden. Dass sich diese Daten nicht auf Entwicklungs- und Schwellenländer übertragen lassen, zeigen neuere Untersuchungen aus Asien. HUSSAIN et al. (2007) ermittelten in einer pakistanischen Untersuchung *Campylobacter*-Nachweisraten für Obst- und Gemüsesalate von 40,9 %, für belegte Brötchen von 32,0 % und für nicht näher spezifizierte Käse- und Milchproben von 10 bis 11 %. Rohes Gemüse aus zwei thailändischen Supermärkten wies eine *Campylobacter*-Prävalenz von 51,9 % bzw. 67,7 % auf (CHAI et al., 2007). Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die *Campylobacter*-erkrankung in nahezu allen Entwicklungs- und vielen Schwellenländern eine weit verbreitete Erkrankung ist (COKER et al., 2002).

Tab. 5: *Campylobacter*-Nachweisraten in frischem Fleisch auf Einzelhandelsebene im Zeitraum von 2002 bis 2005 (modifiziert nach EFSA, 2006)

Land	2005		2004		2003		2002	
	n	% POS						
Frisches Hähnchenfleisch								
Deutschland	1.334	42,1	1.480	43,0	1.396	19,6	1.510	25,0
Niederlande	1.605	23,5	1.477	29,3	1.510	26,0	1.600	31,3
Vereinigtes Königreich	1.791	66,4	1.533	62,2	734	73,0	-	-
Frisches Rindfleisch								
Deutschland	47	2,1	-	-	-	-	-	-
Niederlande	463	1,1	847	0,8	678	0,2	489	0,2
Frisches Schweinefleisch								
Deutschland	391	0,5	454	2,0	188	2,7	254	1,2
Niederlande	389	0	287	1,1	227	0	97	2,1

Legende: n = Anzahl der untersuchten und gemeldeten Proben; % POS = davon positiv (%)

2.5 Nachweisverfahren für thermotolerante *Campylobacter* in Lebensmitteln

2.5.1 Mikrobiologische Nachweisverfahren

2.5.1.1 Grundlagen

Für den Nachweis von *Campylobacter* aus Faeces, Wasser und Lebensmitteln wurden in den letzten 25 Jahren eine Vielzahl von Methoden, Anreicherungsmedien und Nährböden entwickelt (CORRY et al., 1995).

Die Isolierung von *Campylobacter* aus Lebensmitteln gestaltet sich häufig schwierig, da die Keime hohe Anforderungen an die Wachstumsbedingungen stellen und zudem aufgrund äußerer Einflüsse oder technologischer Prozesse subletal geschädigt sein können. Zudem liegen *Campylobacter* in Lebensmitteln oft nur in geringen Keimzahlen vor und stellen nur einen Bruchteil der Gesamtflora im Lebensmittel dar (PARK, 2002). Aufgrund der niedrigen MID ist es jedoch erforderlich, bereits geringe *Campylobacter*-Gehalte in Lebensmitteln nachzuweisen. Die kulturellen Methoden für den Nachweis von *Campylobacter* in Lebensmitteln beinhalten daher einen selektiven Anreicherungsschritt mit nachfolgender Isolierung auf Selektivnährböden, gefolgt von der Bestätigung verdächtiger Isolate aufgrund ihrer morphologischen und biochemischen Eigenschaften, ihres Wachstumsverhaltens in verschiedenen Atmosphären sowie der Sensibilität gegenüber ausgewählten Antibiotika (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die für die Isolierung entwickelten Selektivnährmedien bestehen aus einem Basismedium, Anreicherungssupplementen, Antibiotikamischungen und verschiedenen Zusätzen zur Neutralisation von toxischen Sauerstoffderivaten. In den meisten Formulierungen werden **Basisnährmedien** eingesetzt, die für sehr anspruchsvolle Keime entwickelt wurden, wie Brucella- oder Thioglycolatbouillon, Columbia- oder Blutagar-Basis und Müller-Hinton-Bouillon. Einigen Formulierungen dienen auch weniger anspruchsvolle Medien, wie Nährbouillon Nr. 2, als Basis (CORRY et al., 1995).

Größere Bedeutung als die Wahl des Basismediums besitzt der Zusatz von **Supplementen**, die toxische

Sauerstoffderivate wie Peroxide und Superoxide neutralisieren können. Hierzu zählen defibriniertes Blut oder lysiertes Pferdeblut - meist in Konzentrationen zwischen 5 % und 15 %, Aktivkohle, Haematin oder das sog. FBP-Supplement, eine Kombination aus Eisensulfat, Natriummetabisulfit und Natriumpyruvat (CORRY et al., 1995; SOLOMON und HOOVER, 1999). Nach einer Untersuchung von WONGLUMSOM et al. (2001) ermöglicht der Zusatz von Oxyrase[®] eine Inkubation der Anreicherungsbouillon in normaler Atmosphäre.

Die verschiedenen **Antibiotikakombinationen** wurden aufgrund des Resistenzverhaltens von *Campylobacter* sowie der Unterdrückung einer kompetitiven Flora ausgewählt. Die am häufigsten verwendeten antibiotisch wirksamen Substanzen sind Trimethoprim, Polymyxin, Colistin, Vancomycin, Rifampicin und Cephalosporine. Zur Unterdrückung von Hefen und Schimmelpilzen wird in vielen Medien Cycloheximid, Amphotericin B oder Nystatin eingesetzt. Hinsichtlich der Cephalosporine wird heute Cefoperazon bevorzugt, da verschiedene *Campylobacter* (insbesondere *C. coli*, aber auch einige *C. jejuni*-Stämme) gegenüber Cephalotin empfindlich sind. Insbesondere bei vorgeschädigten *Campylobacter* wurde auch ein Hemmeffekt durch Polymyxin B und Colistin beobachtet. So unterdrückten Polymyxin-Konzentrationen von ≥ 8.000 I.E. das Wachstum zahlreicher *C. jejuni*-Stämme. Um auch Antibiotika-sensitive Stämme nachzuweisen, wurde bei späteren Modifikationen der Nährmedien häufig der Polymyxin-Gehalt verringert und die Konzentration anderer Antibiotika erhöht, oder es erfolgte eine stufenweise Zugabe der Antibiotika. In verschiedenen Untersuchungen wurden auch Spezies-spezifische Unterschiede festgestellt. So wirkt Vancomycin weniger inhibitorisch auf *C. jejuni* wirkt als Rifampicin. Bei der Isolierung der verschiedenen thermotoleranten *Campylobacter* spp. ist auch zu berücksichtigen, dass *C. upsaliensis* aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Cefoperazon und Vancomycin auf den gängigen Nährmedien nicht wächst (CORRY et al., 1995). In den letzten Jahren wurde Cycloheximid wegen seiner potentiellen Toxizität in vielen Rezepturen durch Amphotericin B ersetzt (MARTIN et al., 2002).

Während der Inkubation der Nährmedien wird die Verwendung einer modifizierten **Atmosphäre** mit 5 - 7 % Sauerstoff, 10 % Kohlendioxid und 80 % Stickstoff und/oder Wasserstoff empfohlen (CORRY et al., 1995). Die Generierung und Aufrechterhaltung einer mikroaeroben Atmosphäre lässt sich durch verschiedene Systeme erreichen, wie über den Einsatz gasdichter Gefäße mit entsprechenden Gasentwicklungskits (z. B. CampyGen, Fa. Oxoid) (BUCK et al., 1982), variabel begasbarer Zellbrutschränke (ANNABLE et al., 1998) oder Kammern mit einem Modulare Atmosphere Controlled System (MAKS) (RAYMOND, 2002). Untersuchungen von JONES et al. (1993) und KAAKOUSH et al. (2007) zeigten allerdings, dass in-vitro eine Adaptation zumindest einiger Stämme von *C. jejuni* an einen atmosphärischen Sauerstoff-Partialdruck möglich ist.

Um auch vorgeschädigte *Campylobacter* zu erfassen und die Nachweisrate zu erhöhen, wurde von verschiedenen Autoren eine **mehrstufige Anreicherung** bei verschiedenen Temperaturen und die schrittweise Zugabe bestimmter Antibiotika empfohlen, nachdem mehrere Studien gezeigt hatten, dass *Campylobacter* bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C besser wiederbelebt werden können als bei 42 °C (HUMPHREY, 1986; HUMPHREY und MUSCAT, 1989; PARK und SANDERS, 1991; HUNT, 1992; HUNT et al., 1998).

2.5.1.2 Flüssige Selektivanreicherungsmedien

Um die Wiederfindungsrate zu erhöhen und die Begleitflora effektiver zu unterdrücken, wurden die Anreicherungsverfahren vielfältig modifiziert. Die Änderungen betrafen die Rezeptur der Flüssigmedien, deren Supplementzusammensetzung, die Konzentration der verwendeten Antibiotika, die verzögerte Zugabe der Selektiv-Supplemente sowie die stufenweise Erhöhung der Bebrütungstemperatur. Einen detaillierten Überblick über die Vielzahl der für die Isolierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. publizierten Anreicherungsmedien und Nährböden bieten CORRY et al. (1995), CORRY (1999) und CORRY et al. (2003). Bei den flüssigen Selektivanreicherungsmedien haben die Preston-Bouillon und die Bolton-Bouillon die breiteste Verwendung gefunden.

Die verschiedenen flüssigen Selektivanreicherungsmedien waren Gegenstand mehrerer Vergleichsstudien. So untersuchten STERN und LINE (1992) natürlich kontaminiertes frisches Hähnchenfleisch vergleichend mit den Anreicherungsmedien nach Doyle und Roman, Park und Sanders und Hunt und Radle sowie mit den Selektivnährböden Campy-BAP, mCCDA und Campy-Cefex. Mit der Hunt und Radle-Anreicherung konnten die meisten Nachweise (43 Proben) geführt werden, gefolgt vom Park und Sanders-Medium (40 Proben) und dem Medium nach Doyle und Roman (23 Proben). Bei den Nährböden lieferte mCCDA die besten Ergebnisse.

In einer niederländischen Studie wurden zahlreiche Nährmedien für die Isolierung von thermophilen *Campylobacter* aus Geflügelfleisch vergleichend überprüft (CCD-Bouillon, Preston-Bouillon, Exeter-Bouillon, Park und Sanders-Bouillon, CEB, Karmali-Agar, CCD-Agar, ein halbfestes Medium (SSM), Skirrow-Agar, Exeter-Agar, Preston-Agar). Die höchsten Nachweisraten wurden nach Anreicherung in CCD-Bouillon (24h / 42°C, mikroaerob) und Isolierung auf Karmali-Agar (mit Zusatz von Cefoperazon und Amphotericin B) oder CCD-Medium (48 h / 42 °C, mikroaerob) erzielt (TILBURG und DE BOER, 1994).

UYTTENDAELE und DEBEVERE (1996) verwendeten Preston-Bouillon (mit FBP-Supplement) und mCCD-Agar, um den Einfluss einer 4-stündigen oder 24-stündigen nicht selektiven Voranreicherung bei 37 °C, die Notwendigkeit einer Blutsupplementation und den Effekt einer auf 48 h verlängerten Inkubationsdauer bei mikroaerober Inkubation zu überprüfen. Mit der 4-stündigen Voranreicherung konnten geringe *Campylobacter*-Gehalte - auch beim Vorliegen einer starken Begleitflora - nachgewiesen werden. Eine Verlängerung der Voranreicherung auf 24 h erwies sich als ungeeignet, da *Campylobacter* durch die simultane Vermehrung der Begleitflora unterdrückt wurde. Der Nachweis geringer *Campylobacter*-Zahlen gelang jedoch auch ohne Voranreicherung, so dass von den Autoren aufgrund des geringeren Zeit- und Arbeitsaufwandes die direkte Anreicherung in Preston-Bouillon (24 h bei 42 °C) empfohlen wurde. Die 48-stündige Bebrütung der Preston-Bouillon und die Blutsupplementation ergaben demgegenüber keine statistisch signifikanten Vorteile.

BAYLIS et al. (2000) untersuchten 100 rohe Fleischproben verschiedener Tierarten vergleichend mit Bolton-Bouillon, CEB und Preston-Bouillon. Die Bebrütung erfolgte aerob bei 37°C für 4 h und anschließend bei 42°C über 48 h. Für die Ausstriche wurde mCCDA verwendet. Mit der Bolton-Bouillon wurden signifikant höhere Wiederfindungsraten auf den Selektivnährböden ermittelt als mit CEB und Preston-Bouillon. Bei Verwendung der Preston-Bouillon trat mehr Begleitflora auf.

2.5.1.3 Feste Selektivmedien

Für die Isolierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. werden verschiedene Blut- oder Kohlehaltige Nährböden mit unterschiedlichen Hemmstoff-Supplementierungen empfohlen. In mehreren Vergleichsstudien konnte die Überlegenheit der kohlehaltigen Selektivmedien nach Karmali und des modifizierten Charcoal-Cefoperazone-Desoxycholate-Agars (mCCDA) gegenüber den bluthaltigen Nährböden bezüglich der Wiederfindung und der Unterdrückung der Begleitflora belegt werden (GUN-MUNRO et al., 1987; GRIFFITHS und RIBEIRO, 1988; ENDTZ et al., 1991a; ALBERT et al., 1992; TILBURG und DE BOER, 1994; PIERSIMONI et al., 1995; WHYTE et al., 2003).

Der in der revidierten ISO 10272-1:2006 als primäres Selektivmedium vorgeschriebene mCCDA war bereits in den 1990er Jahren Gegenstand mehrerer Vergleichsstudien. ZANETTI et al. (1996) erzielten mit mCCDA, Butzler- und Preston-Agar ähnliche Ergebnisse, wobei mCCDA leicht überlegen war. Die Autoren stellten fest, dass der Bebrütungstemperatur eine größere Bedeutung zukam, denn bei 42 °C konnten mehr Stämme isoliert werden als bei 37 °C. Auch in einer skandinavischen Laborvergleichsuntersuchung wurden mit mCCDA- und Preston-Agar nach Anreicherung in Preston-Bouillon identische Wiederfindungsraten ermittelt. Auf mCCDA trat jedoch weniger Begleitflora auf (PETERZ, 1991). In einer Untersu-

chung von ENGBERG et al. (2000) wurden mit dem mCCDA im Vergleich zu Skirrow- und CAT-Agar signifikant höhere Nachweisraten erzielt. Eine Verlängerung der Bebrütungsdauer von 48 h auf 5 bis 6 Tage erbrachte keine signifikante Steigerung der Wiederfindungsraten.

Zur Verminderung einer störenden Begleitflora bei der Isolierung von *Campylobacter* wird auch eine **Membranfiltermethode** empfohlen (SCOTTER et al., 1993; ELMER-ENGLHARD et al., 1998; BAUMGART und BECKER, 2004). Diese ursprünglich für die Untersuchung von Stuhlproben entwickelte Technik (STEELE und MCDERMOTT, 1984) basiert auf der ausgeprägten Beweglichkeit von *Campylobacter*, welche den Keim schneller als die Begleitkeime einen Cellulosefilter (0,45 µm oder 0,65 µm Porengröße) passieren lässt. Durch die Verwendung Antibiotika-freier Blutnährböden können mit dieser Methode auch seltene *Campylobacter* spp. wie *C. upsaliensis* isoliert werden, allerdings mit einer im Vergleich zur Direktkultur deutlich geringeren Sensitivität (GOOSSENS et al., 1986; MORENO et al., 1993; ATABAY und CORRY, 1997). Im Zusammenhang mit dem Nachweis von *Campylobacter* aus Lebensmitteln wird der blasenfrei auf einem Selektivnährboden aufliegende Membranfilter mit der bebrüteten Selektivanreicherungsbouillon beimpft und für ca. eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Filters wird der verwendete Selektivnährboden dem Prüfverfahren entsprechend weiter bebrütet.

Für die Isolierung von *Campylobacter* wurde auch ein **halbfestes Medium** ohne Blutzusatz entwickelt (GOOSSENS et al., 1989). Aufgrund des deutlichen Schwärmens von *Campylobacter* eignet sich dieses Substrat allerdings nicht für quantitative Untersuchungen. In den letzten Jahren wurden auch im Bereich der *Campylobacter*-Diagnostik vermehrt **chromogene Nährmedien** propagiert, die durch eine markante Koloniefärbung eine leichtere Differenzierung zwischen *Campylobacter*-Kolonien und der unspezifischen Begleitflora ermöglichen sollen. Dazu zählen der durchscheinende Campy-Line-Agar (CLA) sowie der Campy-Line-Blutagar (CLBA), jeweils mit Zusatz von TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid), auf denen *Campylobacter* als tief-rote Kolonien erscheinen. Beide Medien zeigten in einer Vergleichsstudie mit Campy-Cefex-Agar vergleichbare Wiederfindungsraten (LINE, 2001). Ein weiteres chromogenes Medium stellt der CampyFood ID™-Agar (Fa. Biomerieux) dar, dem HABIB et al. (2008) allerdings gewisse Schwächen bei der Auswertung attestierten, da Kolonien von Nicht-Zielorganismen eine ähnliche Rotfärbung aufwiesen wie *Campylobacter*.

2.5.1.4 Normierung der Nachweisverfahren

Bis Mitte der 1990er Jahren gab es lediglich auf nationaler Ebene einzelne normierte Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter* in Lebensmitteln, wie die amerikanische BAM-Methode der U.S. Food and Drug Administration, die britische PHLS-Methode, die niederländische Richtlinie NEN 6269:1993, die Methode NMKL Nr. 119 der skandinavischen Länder oder die Methode 7.19 aus dem Schweizer Lebensmittelbuch.

Auf internationaler Ebene erfolgte eine erste Normierung eines Untersuchungsverfahrens für *Campylobacter* spp. im Jahr 1995 mit der Veröffentlichung der **ISO-Norm 10272:1995 (E)** zum horizontalen Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Lebens- und Futtermitteln. Die Norm beinhaltet zwei Verfahren, die sich hinsichtlich des Anreicherungsschrittes unterscheiden. Zum einen wird Preston-Bouillon als flüssiges Anreicherungsmedium vorgeschlagen. Alternativ wird die Verwendung der Park und Sanders-Bouillon bei Proben empfohlen, in denen *Campylobacter* durch ungünstige Umwelteinflüsse oder technologische Bearbeitung (z. B. Gefrierprozesse) vorgeschädigt sein könnten. In diesem Fall erfolgt die Anreicherung mehrstufig bei verschiedenen Temperaturen und unter schrittweiser Supplementierung der Antibiotika. Für die Kultivierung auf festen Nährböden werden der Karmali-Agar und ein weiteres festes Selektivmedium nach Wahl des Anwenders (Butzler-, Skirrow-, Preston-Agar oder CCDA) empfohlen. Abb. 3 gibt einen schematischen Überblick über den Untersuchungsgang nach ISO 10272:1995 (E) (ISO, 1995).

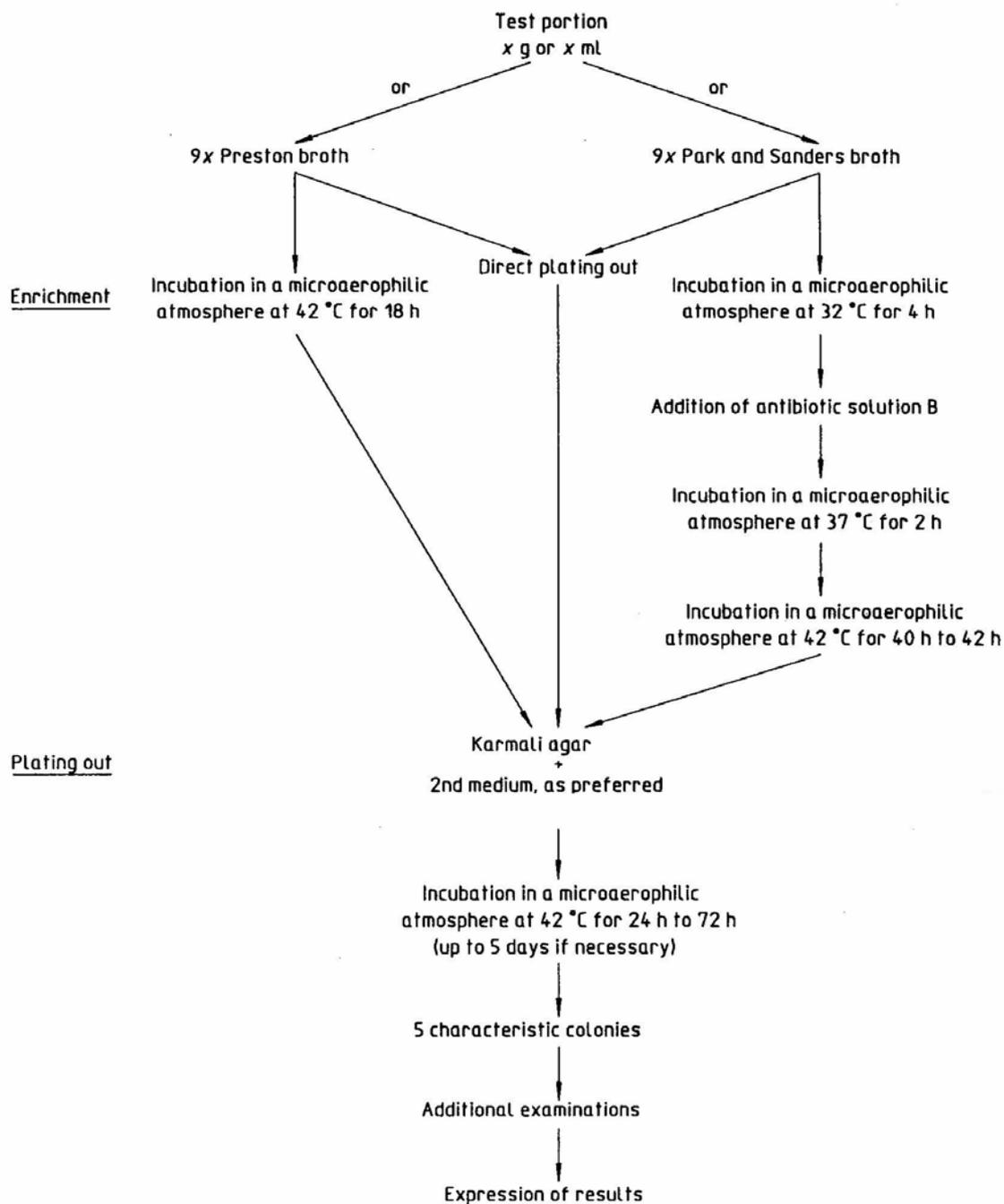


Abb. 3: Fliessdiagramm zum Verfahrensablauf nach ISO 10272:1995 (E) (entnommen aus ISO, 1995)

Die in der ISO-Norm 10272:1995 (E) veröffentlichten Anreicherungsverfahren nach Preston sowie Park und Sanders waren Gegenstand mehrerer Vergleichsstudien.

FEDERIGHI et al. (1999) erzielten bei der Untersuchung von Geflügelfleischprodukten, Austern und zerkleinertem Gemüse mit dem Park und Sanders-Medium mehr Nachweise (19 Proben) als mit Preston-Bouillon (8 Proben). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Studie von TANGVATCHARIN et al. (2005), die natürlich kontaminiertes Hähnchenbrustfilet parallel mit beiden Anreicherungsverfahren gemäß ISO 10272:

1995 (E) sowie mittels unterschiedlicher Probenvorbereitung (destruktive Probenahme und Spülprobe der Oberfläche) untersuchten. Mit der Park und Sanders-Bouillon wurde sowohl in den Spülproben als auch nach destruktiver Probenahme eine signifikant höhere Nachweisrate ermittelt. Auch in einer weiteren Arbeit erwies sich die Park und Sanders-Anreicherung der Preston-Bouillon bei der Untersuchung von gekühltem und gefrorenem Hähnchenfleisch als überlegen (DE BOER und HUMPHREY, 1991).

In Rahmen einer britischen Laborvergleichsuntersuchung wurde natürlich kontaminierte gefrorene Hühnerhaut auf der Grundlage des ISO-Normentwurfes untersucht (SCOTTER et al., 1993). Der Methodenvergleich umfasste einen Ansatz mit Preston-Bouillon ohne FBP-Supplement (mikroaerobe Bebrütung bei 42 °C über 48 h), einen Ansatz mit Park und Sanders-Bouillon (aerobe Inkubation) sowie einen Ansatz mit Preston-Bouillon mit FBP-Supplement (aerobe Bebrütung bei 37 °C über 4 h, dann 42 °C über 44 h). Während bei einem *Campylobacter*-Gehalt von 10 KbE/10 g Probenmaterial alle drei Methoden vergleichbare Ergebnisse lieferten, erbrachte bei geringeren Keimdichten von ca. 2 KbE/10 g die Park und Sanders-Bouillon signifikant höhere Nachweisraten. Die 4-stündige Vorbebrütung der Preston-Bouillon bei 37 °C ergab keine Verbesserung.

Dagegen sahen JOSEFSEN et al. (2002) Vorteile bei der Verwendung des Preston-Verfahrens. Die Untersuchung von 20 natürlich kontaminierten Hähnchenkarkassen (Spülproben) führte mit beiden Verfahren zu übereinstimmenden Isolierungsraten hinsichtlich des qualitativen Nachweises. Bei der semi-quantitativen Bestimmung mittels Titerverfahren wiesen allerdings 13 von 20 Spülproben mit dem Preston-Verfahren höhere Keimgehalte auf, was die Autoren auf eine bessere Sensitivität des Preston-Protokolls zurückführten. Diese Vermutung konnte durch einen Inokulationsversuch mit *C. jejuni* bestätigt werden, bei dem für das Preston-Verfahren eine Sensitivität von 1 KbE/10 ml Bouillon gegenüber 100 KbE/10 ml Bouillon bei der Park und Sanders-Methode ermittelt wurde. Als weitere Vorteile des Preston-Protokolls wurden der geringere Arbeitsaufwand aufgrund der einheitlichen Inkubationsbedingungen, die kommerzielle Verfügbarkeit und das geringere Kontaminationsrisiko genannt.

Im Zuge der **Revision der ISO 10272:1995 (E)** wurden Preston- sowie Park und Sanders-Bouillon durch Bolton-Bouillon als Selektivanreicherung ersetzt (ISO, 2006a). Die Bebrütung des bereits vollständig supplementierten Mediums erfolgt zunächst für 4 Stunden bei 37 °C und anschließend für 24 bis 48 Stunden bei 41,5 °C. Für die Kultivierung auf Nährböden werden der mCCDA und ein weiterer - vom Labor auszuwählender - Selektivnährboden vorgeschrieben. Im April 2007 wurde die ISO-Norm 10272-1:2006 als Methode L 00.00-107 in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB übernommen (BVL, 2007) und damit für Deutschland verbindlich.

2.5.2 Identifizierung und Differenzierung

2.5.2.1 Phänotypische Identifizierung und Differenzierung

Thermotolerante *Campylobacter* sind phylogenetisch eng verwandte Spezies (ON, 2001). Es stehen daher nur wenige phänotypische Unterscheidungskriterien zur Verfügung. Die wichtigsten Differenzierungsmerkmale innerhalb der Familie der *Campylobacteriaceae* sind in Tab. 1 (s. Seite 3) zusammengestellt. In der Routinediagnostik, normiert durch die ISO 10272:1995 (E), werden neben morphologischen und biochemischen Eigenschaften die Überprüfung des Wachstumsverhaltens und die Sensibilität gegenüber ausgewählten Antibiotika zur Unterscheidung der Spezies herangezogen: Wachstum bei 25 °C, aerobes Wachstum, Katalase-Reaktion, Oxidase-Reaktion, Hippurat-Hydrolyse, Indoxyl-Acetat-Hydrolyse, Kohlehydratverwertung, H₂S-Produktion, Überprüfung der Empfindlichkeit gegen Cephalotin und Nalidixinsäure (ISO, 1995).

Der **Hippurat-Hydrolyse-Test** ermöglicht die Differenzierung von *C. jejuni*, der als Alleinstellungsmerkmal über eine Hippurikase verfügt, gegenüber den übrigen thermotoleranten *Campylobacter* spp.

(HARVEY, 1980; SKIRROW und BENJAMIN, 1980). Bei der Beurteilung dieser Reaktion ist allerdings zu berücksichtigen, dass hippurat-negative *C. jejuni*-Stämme vorkommen und die Reaktion durch die Inokulummenge und die verwendeten Nährböden beeinflusst werden kann (TOTTEN et al., 1987; ON und HOLMES, 1991; RAUTELIN et al., 1999). LINTON et al. (1997) berichteten über *C. jejuni*-Stämme, die trotz Vorhandenseins des Hippurikase-Gens phänotypisch nicht in der Lage waren, Hippurat zu hydrolysieren. Zudem konnte beobachtet werden, dass einige *C. jejuni*-Stämme die Fähigkeit zur Hippurat-Hydrolyse nach wenigen Passagen verlieren (BÄR und FRICKE, 1987). Andere, biochemisch als *C. coli* identifizierte Stämme konnten erst mittels genotypischer Methoden (PCR und PCR-RFLP) als hippurat-negative *C. jejuni* charakterisiert werden (RAUTELIN et al., 1999; STEINHAUSEROVA et al., 2001).

Durch die Überprüfung der **Sensibilität** gegenüber den Antibiotika Cephalotin und Nalidixinsäure lassen sich *C. jejuni* und *C. coli* gegen *C. lari* abgrenzen. Die Ergebnisse der Resistenzprüfung müssen jedoch vorsichtig beurteilt werden, da mit zunehmender Verbreitung der Fluorochinolon-Resistenz in den letzten beiden Jahrzehnten auch vermehrt Nalidixinsäure-resistente Stämme von *C. jejuni* auftreten (ALTWEGG et al., 1987; ENDTZ et al., 1991b; LUBER, 2004; NANNAPANENI et al., 2005).

Einer weiteren, gut reproduzierbaren Reaktion zur Abgrenzung von *C. lari* bedient sich der von POPOVIC-UROIC et al. (1990) publizierte **Indoxylacetathydrolyse-Test**. Die Methode wurde 2006 in die Revision der ISO-Norm 10272 aufgenommen.

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wird zur phänotypischen Charakterisierung der Isolate häufig die **Serotypisierung** eingesetzt. Zwei Methoden haben breitere Verwendung gefunden: zum einen das Verfahren nach PENNER und HENNESSY (1980), das auf dem Nachweis von hitzestabilen Oberflächenantigenen (HS-System) mittels passiver Hämagglutination beruht, und zum anderen das Verfahren nach LIOR et al. (1982), das hitzelabile Oberflächenantigene (HL-System) mittels Objektträgeragglutination nachweist. Inzwischen wurde die Methode nach Penner modifiziert und ein neues verbessertes System entwickelt, das sich der aktiven Hämagglutination bedient (FROST et al., 1998). Die Anwendung der Serotypisierung wird begrenzt durch das Auftreten von Stämmen, die nicht typisierbar sind oder deren Typisierung infolge von Antigenvariationen instabil ist (NIELSEN et al., 1997; MCKAY et al., 2001). Zudem wurde über das Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen Antiseren berichtet (PRESTON und PENNER, 1989). Weitere Nachteile stellen die hohe Zahl der selbst herzustellenden Antiseren dar, da kein Angebot von kommerziell erhältlichen Antiseren besteht (JACKSON et al., 1998). Letztlich sind **Biotypisierung** (BOLTON et al., 1984) und **Phagentypisierung** (GRAJEWSKI et al., 1985; KHAKHRIA und LIOR, 1992) als weitere phänotypische Differenzierungsverfahren zu nennen.

2.5.2.2 Genotypische Differenzierung

Zur Aufklärung von Infektionsketten und zur Untersuchung populationsstruktureller Fragestellungen werden verschiedene genotypische Methoden wie PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), *flaA*-SVR (short variable region)-Sequenzierung, Multilocus sequence typing (MLST), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-PCR und Ribotyping eingesetzt. Einen Überblick über die verschiedenen Genotypisierungsmethoden geben WASSENAAR und NEWELL (2000) sowie ZIMMERMANN et al. (2008). Die genotypische Diskriminierung von *Campylobacter*-Isolaten gestaltet sich häufig schwierig, da *Campylobacter* ein verhältnismäßig kleines Genom von ca. 1,6 Mio. bp verbunden mit einer verhältnismäßig geringen Klonalität aufweist (PARKHILL et al., 2000). Die Kombination mehrerer Verfahren erhöht die Diskriminierungsfähigkeit (ZIMMERMANN et al., 2008).

2.5.3 Keimzahlbestimmung

Mit dem im Jahr 1999 von der Codex Alimentarius Commission eingeführten Prinzip der quantitativen mikrobiologischen Risikoschätzung ergab sich ein weitergehender Bedarf nach vergleichbaren quantitativen Daten zum Vorkommen von *Campylobacter* insbesondere in Geflügelfleisch.

Erschwert wurde die Datensammlung durch die Tatsache, dass lange Zeit kein **standardisiertes Untersuchungsverfahren** für die Zählung von *Campylobacter* spp. existierte. Mit der ISO/TS 10272-2 wurde im Jahr 2006 erstmals eine normierte Methode veröffentlicht, die auf dem Spatelverfahren unter Einsatz des mCCDA beruht (ISO, 2006b). Ein Jahr später wurde vom Nordic Committee on Food Analysis eine Methode für die Quantifizierung von *Campylobacter* erarbeitet, die sowohl ein quantitatives Spatelverfahren als auch ein – bei zu erwartenden geringen *Campylobacter*-Zahlen anzuwendendes – halbquantitatives Titerverfahren umfasst (ROSENQVIST et al., 2007). Für den Nachweis geringer Keimzahlen bietet sich als Alternative zum direkten Plattenzählverfahren auch die MPN-Technik an, die allerdings mit einem höheren Arbeits- und Materialaufwand verbunden ist. Der Vorteil dieser Technik liegt vor allem in der höheren Empfindlichkeit, da durch den Einsatz größerer Volumina (10 ml) die Nachweisgrenze auf 0,03 MPN/g bzw. ml gesenkt werden kann (HILDEBRANDT und SCHOTT, 2001).

LINE et al. (2001) führten vergleichende quantitative Untersuchungen an frischem Hähnchenfleisch mittels zweier MPN- und eines Spatelverfahrens durch. Das MPN-Verfahren unter Verwendung des Flüssigmediums nach Hunt und dem mCCDA sowie das Spatelverfahren (Campy-Cefex-Agar) ergaben bei Spülproben keine signifikanten Unterschiede. Auch bei einer von SCHERER et al. (2006) durchgeführten Studie zeigten das Spatelverfahren und die MPN-Technik bei Spülproben eine gute Korrelation der Ergebnisse, während sich die MPN-Technik bei Hautproben als ungeeignet erwies.

Die Auswahl des Selektivagars scheint für die quantitative Bestimmung von untergeordneter Bedeutung zu sein. Bei Verwendung verschiedener Selektivnährböden (u. a. Skirrow, Karmali, mCCDA, Campy-Cefex, Campy-Agar, CampyFood ID™-Agar) wurden jeweils vergleichbare Keimzahlergebnisse erzielt (OYARZABAL et al., 2005; BfR, 2006c; HABIB et al., 2008). Nach HABIB et al. (2008) war jedoch die Auswertung des CampyFood ID™-Agars (Fa. Biomerieux) bei natürlich kontaminierten Proben im Vergleich mit mCCDA- und Karmali-Agar erschwert, da Kolonien der Nicht-Zielorganismen eine ähnliche Rotfärbung aufwiesen wie *Campylobacter*.

Die Studien zur quantitativen Bestimmung von *Campylobacter* unterscheiden sich allerdings nicht nur bezüglich der eingesetzten Untersuchungsverfahren sondern auch hinsichtlich der **Probenaufbereitung** (destruktive und nicht-destruktive Probenahme). Bei der destruktiven Probenahme wird eine definierte Menge Muskulatur mit oder ohne Haut verwendet. Zu den nicht-destruktiven Verfahren zählen die Entnahme von Halshaut, die Beprobung der gesamten Karkassenoberfläche oder ausgewählter Bereiche mittels Tupfer (Tupferprobe) sowie die Spülprobe, bei der die Oberfläche mit einem selektiven Anreicherungsmedium gespült und gegebenenfalls manuell abmassiert wird.

Die verschiedenen Verfahren der Probenvorbereitung wurden in mehreren Studien überprüft. Es zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen Spülproben und Hautproben (SCHERER et al., 2006) noch bei einem Vergleich von Spülflüssigkeit mit Halshaut und Spülflüssigkeit mit gesamter Haut (JØRGENSEN et al., 2002). Die Technik des Spülvorgangs (mechanisches Schütteln oder manuelles Kneten) nahmen nach Untersuchungen von CASON und BERRANG (2002) keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Die in der Literatur verfügbaren quantitativen Daten zur Kontamination von Geflügelfleisch mit *Campylobacter* sind nur schwer vergleichbar, da sich die Untersuchungen hinsichtlich der Probenart (ganzer Schlachtkörper oder Teilstücke, mit oder ohne Haut, Angebotszustand), der Probenvorbereitung (destruktiv, Halshaut, Spülprobe, Tupferprobe) und des Untersuchungsverfahrens (Spatelverfahren oder MPN) unterscheiden. Zudem erfolgt die Ergebnisangabe je nach Probenvorbereitung pro ml Spülflüssigkeit, pro Gramm Einwaage (Haut oder Muskulatur) oder pro cm² (Tupferprobe) (BfR, 2005).

Zwei in Deutschland durchgeführte Studien befassten sich mit der Quantifizierung von *Campylobacter* auf der Oberfläche von frischen Hähnchenschenkeln (SCHERER et al., 2006) bzw. auf der Oberfläche und im Muskelinneren von frischen Hähnchenbrustfilets (LUBER und BARTELT, 2007). Im Muskelinneren konnten deutlich niedrigere *Campylobacter*-Gehalte (Median: log 0,15 KbE/g) ermittelt werden, als auf der Oberfläche (Median: log 2,7 KbE/Filetoberfläche). Die Daten in Tab. 6 zeigen, dass Hähnchenteilstücke mit Haut (Keulen) auf der Oberfläche höhere *Campylobacter*-Keimzahlen aufwiesen als Teilstücke ohne Haut (Brustfilets).

JØRGENSEN et al. (2002) führten in England Untersuchungen an frischen und gefrorenen ganzen Hähnchen aus dem Einzelhandel durch. Abhängig von der Probenvorbereitung wurden unterschiedliche mittlere *Campylobacter*-Keimzahlen ermittelt (Tab. 6). Dabei wurde die Nachweisgrenze bei 48 % der frischen Proben, aber nur bei 15 % der gefrorenen Hähnchen überschritten.

Tab. 6: Keimzahlen und Prävalenzen von *Campylobacter* in Hähnchenfleisch

Probenmatrix	Nachweisrate	Keimzahl	Referenz
Ganze Hähnchen:		Mittelwerte:	
Halshaut	84 %	log 4,1/Probe	JØRGENSEN et al. (2002)
Spülprobe	86 %	log 4,9/Probe	
Spülprobe + gesamte Haut	90 %	log 5,1/Probe	
Hähnchenschenkel:			
Spülprobe	77 %	Median: log 4,3 KbE/Schenkeloberfläche	SCHERER et al. (2006)
Hauteinwaage	70 %	Median: log 4,0 KbE/Schenkeloberfläche	
Hähnchenbrustfilet:			
Oberfläche	87 %	Median: log 2,7 KbE/Filet 28 % zw. log 3,0 und log 4,0	LUBER und BARTELT (2007)
Muskulatur (Tiefe)	20 %	Median: log 0,15 KbE/g	

2.5.4 Molekularbiologischer Nachweis und Speziesdifferenzierung

Aufgrund der komplexen Taxonomie, der hohen Wachstumsansprüche und der geringen biochemischen Stoffwechselaktivität sind Nachweis und Identifizierung von *Campylobacter* spp. mittels phänotypischer Methoden oft schwierig und zeitaufwändig. Für die Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* wird im Routinelabor als einziger phänotypischer Test üblicherweise nur die Hippurathydrolyse durchgeführt, die aufgrund des Vorkommens von hippurat-negativen *C. jejuni*-Stämmen nicht immer zuverlässige Ergebnisse liefert. Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) steht ein schnelles, spezifisches genotypisches Verfahren zur Verfügung, das sowohl für den Nachweis von *Campylobacter* aus Lebensmitteln als auch für die Speziesdifferenzierung eingesetzt werden kann (WEGMÜLLER et al., 1993; BIRKENHEAD et al., 1993; OYOFO et al., 1997; LÜBECK und HOORFAR, 2002).

2.5.4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Der PCR-Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln umfasst folgende Schritte: (1) eine Anreicherung in flüssigen Nährmedien, (2) Nukleinsäureextraktion und gegebenenfalls Nukleinsäurereinigung, (3) Amplifikation der gesuchten Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer Primer, (4) Nachweis und Bestätigung der spezifischen PCR-Produkte (LÜBECK und HOORFAR, 2002; DIN, 2005a).

In der Regel wird dem molekularbiologischen Nachweis ein kultureller **Anreicherungs-schritt** vorgeschaltet, um bei gering kontaminierten Proben die erforderliche Sensitivität zu erreichen (GIESENDORF et al., 1992). Außerdem wird durch die Anreicherung der Anteil vermehrungsfähiger *Campylobacter*-Zellen gegenüber der Zahl der toten und VBNC-Zellen erhöht (STRAUB et al., 1999). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass in der Lebensmittelmatrix vorhandene PCR-Inhibitoren durch die Anreicherungsflüssigkeit verdünnt werden. Allerdings können bestimmte Bestandteile der Anreicherungsmedien, wie Blut, Hämoglobin und Kohle, zu einer Hemmung der PCR-Reaktion führen (ROSSEN et al., 1992; NG et al., 1997).

Im Rahmen der **Nukleinsäure-Extraktion** wird die bakterielle DNA aus den Zellen freigesetzt. Gleichzeitig soll eine möglichst weitgehende Abtrennung von inhibitorischen Substanzen sowie eine Aufkonzentrierung des Ziel-Organismus erreicht werden. Das grundlegende Schema zur DNA-Extraktion besteht aus mehreren Schritten und kann vielfältig variiert werden. In der Regel erfolgt zunächst eine Pelletierung der Probenbestandteile und Bakterien durch Zentrifugation. Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet resuspendiert und ein Proteinverdau durch Zugabe von Lysozym und Proteinase K durchgeführt. Anschließend erfolgt ein thermischer Zellaufschluss bei 95 bis 100 °C. Durch abschließendes Zentrifugieren werden störende Komponenten abgetrennt und die Nukleinsäuren im Überstand abpipettiert. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades der DNA können weitere Verfahren angewandt werden wie Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (z. B. Phenol-Chloroform-Gemisch), gefolgt von einer Präzipitation mit Ethanol und Isopropanol und anschließenden Waschschritten, Zusatz von Detergentien (z. B. Triton X-100, Sodiumdodecylsulfat) oder eine Resin-basierte Extraktion mit Chelex[®] 100 (LANTZ et al., 1994; MALORNY et al., 2003; DIN, 2006a). Andere DNA-Extraktionsverfahren bedienen sich der Separation von Bakterien mittels antikörperbeschichteter paramagnetischer Perlen (JINNEMAN et al., 1995), der Zentrifugation unter Einsatz eines Dichtegradienten (z. B. Percoll[®]) (LINDQVIST, 1997) oder der Säulenttechnologie, bei der die DNA absorbiert und Inhibitoren durch Waschschriffe eliminiert werden (LANTZ et al., 1994; BERTHELET et al., 1996).

Von zahlreichen Anbietern werden kommerzielle Kits vertrieben, die eine gleichzeitige DNA-Extraktion und –aufreinigung ermöglichen, z.B. DNeasy Tissue Kit (Qiagen), PrepMan[™] Ultra sample Preparation Reagent (Applied Biosystems), High Pure PCR Template Preparation Kit (Boehringer), Nucleo Spin Food (Macherey & Nagel).

Die eigentliche PCR umfasst die in-vitro-**Amplifikation** definierter chromosomaler Gensequenzen, die räumlich durch die sequenzspezifische Hybridisierung zweier Oligonukleotide (Primerpaar) begrenzt werden. Neben dem Primerpaar enthält der Reaktionsansatz ein Gemisch der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP bzw. dUTP), eine hitzestabile DNA-Polymerase sowie den aus dem Probenmaterial nach Anreicherung gewonnenen DNA-Extrakt. In einem Thermocycler wird der Reaktionsansatz genau festgelegten, zyklischen Temperaturveränderungen ausgesetzt, in denen die DNA-Doppelstränge denaturiert werden, die Primer mit dem komplementären DNA-Abschnitt hybridisieren und die Polymerase vom 3'-Ende ausgehend einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Die drei Teilschritte Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese bilden einen PCR-Zyklus, der mehrmals (25 - 50 mal) wiederholt wird. Auf diese Weise wird nach mehreren Zyklen eine annähernd exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht. Die Detektion der gewonnenen Amplifikate erfolgt schließlich mittels Gelelektrophorese oder DNA-Hybridisierung (ANON., 1998a).

Die gebräuchlichste Methode zur **Detektion** der Amplifikate ist die Auftrennung mittels Gelelektrophorese im Agarosegel mit Anfärbung durch Ethidiumbromid und anschließender Darstellung unter UV-Licht.

Durch Mitführen eines DNA-Molekulargewichtsmarkers kann die Fragmentlänge der Amplifikate geschätzt und mit dem gesuchten Fragment verglichen werden. Der Nachweis der PCR-Produkte kann auch mittels Hybridisierung erfolgen. Dazu werden die Amplifikate auf Membranen übertragen, wo sie mit spezifischen einzelsträngigen Sonden hybridisieren, die mit verschiedenen Substanzen (z. B. Digoxigenin, Biotin, Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase) markiert sind. Je nach Art der Markierung erfolgt die Detektion mittels Kolorimetrie oder Chemiluminiszenz (ANON., 1998a). Andere Methoden verwenden einen nachgeschalteten ELISA (PCR-ELISA) zum Nachweis der PCR-Produkte (BOLTON et al., 2002).

Die **Identität des nachgewiesenen PCR-Produkts** sollte entsprechend den Vorgaben der DIN 10134:1998 (DIN, 1998) bzw. der Folgenorm DIN EN ISO 20838:2006 (DIN, 2006b) durch ein geeignetes Verfahren bestätigt werden. Dies kann durch DNA-Sequenzierung, Restriktionsanalyse oder durch Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden (z. B. southernblot- oder slotblot-Technik) erfolgen. Für die pg50/pg3-PCR wurden klonierte digoxygeninmarkierte und biotinylierte Sonden beschrieben (OYOFO et al., 1992; CHUMA et al., 1997), die mit dem mittels blotting auf eine Nylonmembran aufgetragenen Amplifikat hybridisieren und durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Alternativ können auch DIG-markierte PCR-Sonden eingesetzt werden (MÄDE und STARK, 2000; DIN, 2006b). Von verschiedenen Autoren wurde auch die seminested-PCR im Sinne einer Bestätigung des ersten PCR-Produkts eingesetzt (WEGMÜLLER et al., 1993; WAEGEL und NACHAMKIN, 1996).

Ein positives PCR-Ergebnis kann auch kulturell bestätigt werden (DIN, 2005a; DIN, 2006b). Bei der amtlichen Untersuchung von Lebensmitteln müssen alle positiven PCR-Befunde kulturell weiterbearbeitet werden. Die Isolate stehen damit für weitergehende epidemiologische Untersuchungen oder ein Antibiotika-Resistenzmonitoring zur Verfügung. Die Frage der Herkunft der Zielsequenzen von lebensfähigen oder toten Zellen erübrigt sich somit.

2.5.4.2 Zielsequenzen

Für den Gattungs- und/oder Art-spezifischen Nachweis sowie für die Speziesdifferenzierung von *Campylobacter* wurde bis heute eine Vielzahl von PCR-Systemen veröffentlicht. Die Primerbindungsstellen für *Campylobacter*-spezifische PCR-Systeme sind vornehmlich auf Genen lokalisiert, die für verschiedene Virulenzfaktoren oder bestimmte Stoffwechselleistungen kodieren. Bei vielen PCR-Systemen wurden die Primer auf der Grundlage verschiedener Abschnitte des Flagellin A-Gens (*flaA*) entwickelt. Derartige Systeme ermöglichen den Nachweis der Spezies *C. jejuni* und *C. coli*. Andere Primer-Systeme, die auf der 16S rDNA oder der 23S rDNA basieren, können je nach Design zum Gattungsspezifischen Nachweis oder zur Erfassung der Gruppe der thermotoleranten *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und/oder *C. upsaliensis*) eingesetzt werden. Da das Flagellin-Gen einen hohen Grad an Polymorphismus aufweist, wurden bei der Entwicklung neuerer PCR-Methoden häufig Gene ausgewählt, die für lebenswichtige Stoffwechselforgänge kodieren und die unter einem höheren Selektionsdruck stehen, wie *asp* (Aspartatkinase) (LINTON et al., 1997), *ceuE* (periplasmatisches Substratbindungsprotein) (GONZALEZ et al., 1997; BEST et al., 2003), *mapA* (membranassoziertes Protein) (HOUNG et al., 2001; BEST et al., 2003), *gyrA* (Untereinheit der Gyrase) (RAGIMBEAU et al., 1998; IJIMA et al., 2004; MENARD et al., 2005), *hipO* (Hippurikase) (LINTON et al., 1997; DENIS et al., 1999), *yphC* (GTPase) (IJIMA et al., 2004) sowie Gene für eine putative Oxidoreduktase (NOGVA et al., 2000) oder für periplasmatische Proteine (VAN DE GIESSEN et al., 1998).

Für den gleichzeitigen Nachweis mehrerer *Campylobacter*-Spezies in einer PCR-Reaktion verfügen einige Primer über eine oder mehrere inkorporierte Inosinbasen (VAN DOORN et al., 1997), andere Primer sind degeneriert (OYOFO et al., 1992) oder haben interne Wobbles (WEGMÜLLER et al., 1993). Dies ermöglicht den parallelen Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* (OYOFO et al., 1992; WEGMÜLLER et al., 1993) und ggf. zusätzlich auch von *C. lari* und *C. upsaliensis* (VAN DOORN et al., 1997).

2.5.4.3 Sonderformen der Polymerase-Kettenreaktion

Ausgehend von der konventionellen PCR wurden verschiedene Sonderformen der PCR entwickelt, die eine Erhöhung der Sensitivität und Spezifität, eine Verkürzung der Nachweisdauer oder eine Unterscheidung zwischen toten und lebensfähigen Keimen ermöglichen sollten (HILL, 1996).

Bei der **Multiplex-PCR** werden gleichzeitig zwei („Duplex-PCR“) oder mehrere Primerpaare in einer PCR verwendet. Der Nachweis verschiedener Zielsequenzen in einer Reaktion ermöglicht z.B. den parallelen Nachweis mehrerer *Campylobacter*-Spezies (HARMON et al., 1997; VAN DE GIESSEN et al., 1998; HOUNG et al., 2001; BEST et al., 2003; KLENA et al., 2004; WONG et al., 2004) und/oder den Einsatz einer internen Amplifikationskontrolle (DENIS et al., 2001; WANG et al., 2002; PERSSON und OLSEN, 2005). Allerdings kann die Verwendung mehrerer Primerpaare durch Interaktionen zu einem Verlust an Sensitivität führen.

Bei der **nested-PCR** werden zwei Primerpaare in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Das zweite Primerpaar hybridisiert in einer zweiten PCR innerhalb des in der ersten PCR amplifizierten Produktes und führt somit zu einer Steigerung der Sensitivität, da sehr geringe Mengen des ersten Amplifikats durch die zweite PCR über die Nachweisgrenze vervielfältigt werden können. Ebenso wird die Spezifität der PCR verbessert, da unspezifische Produkte aus der ersten Reaktion nicht amplifiziert werden (WINTERS et al., 1997; SACHSE, 2002). Eine Modifikation dieser PCR-Methode stellt die **seminested-PCR** dar, in der nur ein Primer für die zweite PCR innerhalb der amplifizierten Sequenz liegt und der andere Primer aus der ersten PCR stammt. Durch die Anwendung des seminested-Prinzips gelang es WINTERS et al. (1997) die Sensitivität ihres PCR-Systems derart zu erhöhen, dass *C. jejuni* aus Hähnchenspülproben ohne Anreicherungsschritt innerhalb eines Tages isoliert werden konnte. WEGMÜLLER et al. (1993) ermittelten für die erste PCR mit dem äußeren Primerpaar CF03/CF04 eine Nachweisgrenze von 100 Zellen/40 ml Milch, während sich mit der seminested-PCR weniger als 10 Zellen/40 ml Milch nachweisen ließen. Die zweite PCR ermöglichte zudem die spezifische Erfassung von *C. jejuni* und *C. coli*, da *C. lari* nur mit dem ersten Primerpaar, nicht jedoch mit dem zweiten Primerpaar ein typisches PCR-Produkt bildet. WAAGE et al. (1999) überprüften die Sensitivität der von WEGMÜLLER et al. (1993) beschriebenen seminested-PCR für den Nachweis von *Campylobacter* in Fleischproben. Nach 18-stündiger Inkubation in nicht-selektiver Rosef-Bouillon konnte eine Nachweisgrenze von kleiner 3 Kbe/g erzielt werden. Von anderen Autoren wurden seminested-PCR-Systeme auch im Sinne einer Bestätigung des ersten PCR-Produkts eingesetzt (WAEGEL und NACHAMKIN, 1996).

Ein PCR-Verfahren, das die Unterscheidung zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen gestattet, ist die **reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)**. Sie basiert auf dem Nachweis der mRNA, die nur in lebenden Zellen vorkommt und deren Konzentration nach dem Zelltod rasch abnimmt. Bei der RT-PCR wird die Fähigkeit der reversen Transkriptase ausgenutzt, mit Hilfe entsprechender Primer zur mRNA komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren, die wiederum als Matrize für die DNA-Polymerase dienen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der mRNA und der dadurch erforderlichen schnellen mRNA-Aufbereitung sollen die RT-PCR-Methoden häufig weniger sensitiv sein als PCR-Techniken, die auf einem DNA-Nachweis beruhen (SCHEU et al., 1998). In durch Hitzeanwendung inaktivierten *C. jejuni*-Zellen war der mRNA-Nachweis mittels RT-PCR nach vier Stunden nicht mehr möglich (SAILS et al., 1998). Inzwischen stehen jedoch auch für die Isolierung von RNA zuverlässige Methoden zur Verfügung.

In den vergangenen Jahren kamen in der Routineanalytik verstärkt **Real-Time PCR-Methoden** zur Anwendung, da diese durch den Wegfall der Gelelektrophorese eine deutliche Zeit- und Arbeitersparnis bieten. Bei der Real-Time PCR erfolgen der Nachweis und die Bestätigung der Identität des gebildeten PCR-Produkts zeitgleich bereits während der Amplifikation durch Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde und Messung des Fluoreszenzanstiegs. Ein weiterer Vorteil besteht in der geringeren

Kontaminationsgefahr im Anschluss an die Amplifikation, da die Reaktionsgefäße nicht mehr geöffnet werden müssen. LICK et al. (2007) überprüften die Spezifität mehrerer Real-Time PCR-Methoden mit 65 *Campylobacter*-Stämmen. Die Inklusivität war bei allen Methoden sehr gut (96 - 100 %), bei der Exklusivität traten allerdings einige Unsicherheiten auf. So erfassten die für *C. coli* spezifischen Systeme fast immer auch die eng verwandte Spezies *C. hyoilei*, während die auf dem *flaA*-Gen beruhenden Methoden in manchen Fällen die verwandten Arten *C. lari* und *C. upsaliensis* mit detektierten. Die vergleichende Untersuchung von Lebensmittelanreicherungen mit der kulturellen Methode und verschiedenen Real-Time PCR-Verfahren erbrachte weitgehend übereinstimmende Resultate. Aufgrund der hohen Intraspezies-Rekombinationsrate von *Campylobacter* spp. und der damit verbundenen hohen Variabilität in der Sequenz vieler Zielgene empfehlen die Autoren, grundsätzlich zwei Methoden mit unterschiedlichen Zielgenen anzuwenden.

2.5.4.4 Grenzen der PCR

Um eine hohe, effektive Sensitivität des molekularbiologischen Systems zu gewährleisten, sind die Verfahren zur Probenvorbereitung und DNA-Extraktion so auszuwählen, dass der Nachweis von geringen Mengen von *Campylobacter* und die Reduzierung von PCR-inhibierenden Substanzen ermöglicht werden.

Beim Einsatz von PCR-Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln treten häufig **falsch-negative Ergebnisse** infolge einer **Inhibition** der PCR auf. Folgende Faktoren können falsch-negative PCR-Ergebnisse verursachen: (1) Mangel an dem für die Aktivität der DNA-Polymerase essentiellen Magnesium infolge Komplexbildung mit bestimmten Stoffen, (2) Abbau der DNA und/oder Primer durch Nukleasen (DNasen), (3) direkte Hemmung der DNA-Polymerase durch inhibitorische Substanzen in mangelhaft aufgereinigten DNA-Extrakten und (4) Verlust von Ziel-DNA durch die DNA-Extraktion. Einen besonderen Einfluss übt die jeweilige Lebensmittelmatrix aus, wobei negative Wirkungen insbesondere von Caseinbestandteilen, Calciumionen, Proteinasen, Glykogen und Fetten ausgehen. Ebenso können bestimmte Bestandteile der Anreicherungsmedien, wie Blut und Kohle, zu einer Hemmung der PCR-Reaktion führen (ROSSEN et al., 1992; LANTZ et al., 1994; NG et al., 1997; WILSON, 1997; SCHEU et al., 1998).

Um falsch-negative Ergebnisse durch Inhibition der PCR sicher erkennen zu können, werden **Amplifikationskontrollen** eingesetzt, bei denen entweder eine definierte Menge DNA direkt jedem Reaktionsansatz zugefügt (interne Amplifikationskontrolle) oder die DNA in getrennten Reaktionsansätzen einem Aliquot der extrahierten Nukleinsäure beigegeben wird (externe Amplifikationskontrolle) (DIN, 2005a). Bei der internen Amplifikationskontrolle ist zu berücksichtigen, dass eine zu hohe Konzentration des DNA-Standards die Bildung des *Campylobacter*-Amplifikats unterdrücken kann. Die Konzentration des internen Standards muss daher im Labor sorgfältig optimiert werden (DIN, 2006b).

Eine Minimierung oder Ausschaltung inhibitorischer Effekte ist auf verschiedene Weise möglich. In der Lebensmittelmatrix vorhandene PCR-Inhibitoren können bereits im Rahmen der kulturellen Anreicherung durch die Anreicherungsflüssigkeit verdünnt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Separierung der Ziel-Organismen von der Lebensmittelmatrix mittels Zentrifugation oder durch die Verwendung von Antikörper-beschichteten paramagnetischen Perlen dar (OLSVIK et al., 1994; SCHEU et al., 1998). Der DNA-Freisetzung kann auch ein Aufreinigungsschritt, gegebenenfalls unter Einsatz kommerzieller Kits, nachgeschaltet werden. Ein weit verbreitetes System basiert auf Silicasäulen, an welche die Nukleinsäure bindet, während die Inhibitoren durch Waschschritte eliminiert werden. Die Effizienz der verschiedenen Systeme kann in Abhängigkeit von der Art der Lebensmittelmatrix und der verwendeten Anreicherungsmedien erheblich variieren. Aus diesem Grund sieht die DIN EN ISO 22174:2005 vor, dass in festgelegten Abständen eine positive Prozesskontrolle durchgeführt wird, bei der das gesamte Verfahren von der Probenvorbereitung über Anreicherung, DNA-Extraktion, Amplifikation und Detektion mit-

tels einer mit dem Zielkeim inokulierten Probenmatrix überprüft wird (DIN, 2005a).

Ein immer wieder diskutierter Nachteil der PCR sind **falsch-positive Ergebnisse** durch den Nachweis von DNA nicht lebensfähiger Zellen. So erhielten ALLMANN et al. (1995) noch fünf Wochen nach Zugabe hitzeabgetöteter *C. jejuni* zu Rohmilch ein positives PCR-Ergebnis ohne Abschwächung des Signals. Dieses Problem wird durch einen Anreicherungsschritt weitgehend ausgeschaltet, wodurch sich der Anteil vermehrungsfähiger *Campylobacter*-Zellen gegenüber der Zahl der toten und VBNC-Zellen deutlich erhöht (JOSEPHSON et al., 1993; STRAUB et al., 1999). Ebenso bietet die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) eine Möglichkeit, zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen zu unterscheiden (SCHEU et al., 1998).

2.5.4.5 PCR-Systeme zum Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* in Lebensmitteln

Die Sensitivität der für den Nachweis von *Campylobacter* aus Lebensmitteln entwickelten PCR-Systeme wird entscheidend durch die Effizienz des **Nukleinsäure-Extraktionsverfahren** beeinflusst. MÄDE und STARK (2000) verglichen drei Techniken zur Nukleinsäure-Extraktion aus angereichertem Probenmaterial. Die Verdauung der Proben mit Proteinase K und SDS und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion war der zweiten Methode überlegen, bei der ein Zellaufschluss durch Kochen mit Triton X-100 und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt wurde. Bei Anwendung eines kommerziellen Extraktionskits (Wizard® Genomic DNA Extraktion Kit, Promega) konnte in der PCR keine ausreichende Sensitivität erzielt werden, insbesondere wenn Fleisch oder Innereien als Matrix dienten. MANZANO et al. (1995) erzielten dagegen bei der Untersuchung von künstlich und natürlich kontaminierter Geflügelhaut mit Proteinase K-Verdau und anschließender thermischer Lyse bessere Ergebnisse als mit der zeitintensiveren Phenol-Chloroform-Extraktion. In anderen Studien wurden Extraktionsverfahren überprüft, die auf der Bindung der Nukleinsäuren an eine Silicamatrix beruhen (STRAUB et al., 1999). Bei Verwendung von bluthaltiger Bolton-Bouillon als Anreicherungsmedium ließen sich Inhibitionseffekte durch Medienbestandteile und Probenmatrix am wirkungsvollsten durch eine Resin-basierte Extraktion mit Chelex® 100 begrenzen (JOSEFSEN et al., 2004b).

Bei reinen Stammkulturen und Isolaten wird häufig nur eine **thermische Zellyse** durchgeführt. Allerdings wurde mehrfach über das Vorkommen von *Campylobacter*-Isolaten berichtet (bis zu 20 % der untersuchten Stämme), bei denen eine derartige Behandlung nicht ausreichte, um einen für die Amplifikation geeigneten DNA-Extrakt zu gewinnen (MANZANO et al., 1995; MOHRAN et al., 1998; ON und JORDAN, 2003). ENGLER und KELLEY (2000) entwickelten für die DNA-Isolierung aus derartigen Stäm-

men ein Verfahren, das eine mechanische Zerkleinerung unter Einsatz eines Guanidin-basierten Reagenz (z. B. DNAzol) umfasst und welches den enzymatischen Aufschlussverfahren mit Lysozym, Proteinase K oder Proteinase K mit Zusatz von Tween 20 und NP-40 überlegen war. Auch in anderen Vergleichsstudien war der Zellaufschluss mittels Kochen anderen Extraktionsverfahren unterlegen, wie der DNA-Aufreinigung mit Cethyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (HERNANDEZ et al., 1995) oder der Dichtegradient-Zentrifugation unter Verwendung von Percoll® (WANG et al., 1999). Sehr niedrige Nachweisgrenzen konnten auch durch die Separation von *Campylobacter* mittels antikörperbeschichteter paramagnetischer Perlen erzielt werden (DOCHERTY et al., 1996; LAMOUREUX et al., 1997; WALLER und OGATA, 2000; LUND et al., 2003).

In mehreren Studien wurde die Eignung der verschiedenen Primer-Systeme zum Nachweis von *Campylobacter* in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes überprüft, indem die Sensitivitäten des PCR-Verfahrens und der kulturellen Methode verglichen wurden. Für den Einsatz als schnelle Screeningmethode muss das PCR-Verfahren mindestens die Sensitivität der kulturellen Nachweismethode erreichen.

MÄDE und STARK (2000) verglichen sechs konventionelle PCR-Systeme untereinander sowie mit der kul-

turellen Methode nach ISO 10272:1995 (E) unter Verwendung von Preston-Bouillon und Preston-Agar. Die auf dem Flagellin basierende pg50/pg3-PCR nach OYOFO et al. (1992) und die seminested-PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993) sowie die von VAN DOORN et al. (1997) entwickelten Primerpaare für das GTPase-Gen wiesen die höchste Sensitivität auf. Die Nachweisgrenze entsprach jener der kulturellen Methode und betrug 1,4 KbE/ml inokulierter Milch.

MANZANO et al. (1995) überprüften die Sensitivität der pg50/pg3-PCR zum Nachweis von *Campylobacter* in Geflügelfleisch, wobei die PCR sowohl direkt als auch nach einer sechsständigen Anreicherung durchgeführt wurde. Im Vergleich mit dem kulturellen Direktausstrich wies die direkt aus dem Homogenisat durchgeführte PCR eine geringe Sensitivität von nur 75 % auf. Durch die Anreicherung konnte die Sensitivität der PCR auf 94 % erhöht werden. Mit einem blutfreien kohlehaltigen Selektivanreicherungsmedium wurden schlechtere Resultate erzielt, vermutlich aufgrund von Inhibitionseffekten durch die Kohle. Die Nachweisgrenze der pg50/pg3-PCR lag ohne vorausgehende Anreicherung bei $10^2 - 10^3$ *Campylobacter/g* artifiziell oder natürlich kontaminiertem Probenmaterial.

Vergleichende Untersuchungen von 200 tiefgekühlten Geflügelfleischerzeugnissen mit Hilfe der PCR nach OYOFO et al. (1992) und der kulturelle Methode nach ISO 10272:1995 (E) ergaben zu 100 % übereinstimmende Resultate (BRECHTEL et al., 2002).

Bei Anwendung der auf dem *flaA*-Gen beruhenden Primersysteme wurde wiederholt über das Auftreten unspezifischer PCR-Produkte berichtet. Als Ursachen wurden der geringe G/C-Gehalt der Sequenz und die niedrige Annealingtemperatur diskutiert (OYOFO et al., 1992; HARMON et al., 1997). Zudem weist das *flaA*-Gen eine erhebliche Stamm-spezifische Variation auf, so dass diese Gensequenz für die Entwicklung von Real-Time PCR-Systemen weniger geeignet erscheint (NOGVA et al., 2000).

ON und JORDAN (2003) evaluierten die Inklusivität und Exklusivität von 11 konventionellen PCR-Systemen für den Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* mit Hilfe von 111 *Campylobacter*-Stämmen. Dabei zeigten die PCR-Systeme für die Identifizierung von *C. coli* eine Inklusivität und Exklusivität von 100 %, während die Überprüfung der PCR-Systeme für die Identifizierung von *C. jejuni* sehr unterschiedliche Ergebnisse lieferte. So lag die Exklusivität zwischen 84 % und 100 %, die Inklusivität reichte von 88 % bis 100 %. Kein einziges der geprüften PCR-Systeme war in der Lage, alle 57 *C. jejuni*-Stämme zu identifizieren. Unbefriedigende Resultate waren nach Ansicht der Autoren in erster Linie auf die mangelnde Reinheit der DNA-Extrakte zurückzuführen. So ließ sich in mehreren Fällen die extrahierte *C. jejuni*-DNA erst nach Aufreinigung amplifizieren, wobei einige Primer-Systeme in dieser Hinsicht empfindlicher reagierten. Ein weiteres Problem stellte die große genetische Diversität von *C. jejuni* dar, die sich unter anderem durch das Auftreten unterschiedlich großer Amplifikate in dem 23S rRNA-PCR-System zeigte.

Europaweit wurden mehrere **Ringversuche** durchgeführt, um konventionelle PCR-Systeme für den Nachweis von *Campylobacter* in Lebensmitteln zu validieren. Im Rahmen des europäischen „FOOD-PCR“-Projekts wurde ein auf der 16S rRNA basierendes PCR-System zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* unter Verwendung von DNA-Extrakten von 10 Zielorganismen und 8 Nicht-Zielorganismen sowie unter Beteiligung von 12 Laboratorien überprüft. Aufgrund der ermittelten Werte für die Leistungskenngrößen Inklusivität (93,7 %), Exklusivität (100 %), Akkordanz (93,4 %) und Konkordanz (93,2 %) wurde das Primer-System als für den Einsatz im Anwenderlabor geeignet eingestuft (LÜBECK et al., 2003a,b). In einem anschließenden Ringversuch wurde das PCR-System anhand von künstlich kontaminierten Lebensmittelproben evaluiert. Der Amplifikation wurden ein 20-stündiger Anreicherungsschritt in Bolton-Bouillon und eine Resin-basierte DNA-Extraktion vorgeschaltet. Für Hähnchen- und Schweinekarkassen wurden eine Sensitivität von 96,7 % und 94,2 % sowie eine Spezifität von 100 % und 83,3 % ermittelt (JOSEFSEN et al., 2004a).

2.5.4.6 Normierung PCR-basierter Nachweisverfahren

Um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von PCR-Ergebnissen zu gewährleisten, wurden in der DIN-Norm 10134:1998 erstmals allgemeine verfahrensspezifische Mindestanforderungen für den Nachweis von Mikroorganismen mittels PCR in Lebensmitteln festgelegt. Aus der Weiterentwicklung dieser Norm gingen vier Standards hervor, die einerseits allgemeine Anforderungen und Begriffsbestimmungen enthalten (DIN EN ISO 22174:2005) und die sich andererseits mit spezifischen Fragestellungen wie der Probenvorbereitung (DIN EN ISO 20837:2006), der Amplifikation und Detektion (DIN EN ISO 20838:2006) sowie der Leistungsprüfung von Thermocyclern (DIN ISO/TS 20836:2005) befassen.

Für den molekularbiologischen Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* in Lebensmitteln wurde inzwischen eine vorläufige prävalidierte Methode in die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB aufgenommen (BVL L 00.00-96(V)), die sich an dem System von OYOFO et al. (1992) orientiert.

Der Vorteil PCR-basierter Nachweismethoden liegt insbesondere in der Zeitersparnis, da negative Ergebnisse mit der PCR aus Anreicherungsmedien innerhalb von 2 Tagen vorliegen, während das kulturelle Verfahren nach ISO 10272-1:2006 mindestens 4 Tage dauert. Die PCR kann somit als schnelle Screeningmethode eingesetzt werden, z. B. im Rahmen von Eigenkontrolluntersuchungen der Lebensmittelunternehmen oder zur schnellen Identifizierung *Campylobacter*-positiver Herden im Rahmen der „strategischen Schlachtung“ (JOSEFSEN et al., 2004a).

2.5.5 Sonstige Schnellmethoden

Die Arbeiten zur Verkürzung des *Campylobacter*-Nachweises konzentrierten sich zunächst auf die Entwicklung biochemischer und immunologischer Testkits, welche die zeit- und arbeitsintensiven, mitunter im Ergebnis auch unsicheren **Bestätigungs- und Differenzierungsreaktionen** verdächtiger Isolate vereinfachen und beschleunigen sollten. Ein in der Routinediagnostik häufig eingesetzter kommerzieller Testkit ist das api Campy[®] System (Fa. bioMérieux), das eine schnelle Identifizierung von *Campylobacter*-Isolaten auf der Grundlage von achtzehn Stoffwechselreaktionen und der Empfindlichkeitsprüfung gegenüber drei Antibiotika ermöglicht. Gegenüber der konventionellen phänotypischen Differenzierung zeigte das System jedoch Schwächen bei der Identifizierung von *C. coli* und *C. lari*, während die Bestätigung von *C. jejuni* zuverlässiger gelang (HUYSMANS et al., 1995; RAUTELIN et al., 1999). Andere kommerzielle Systeme basieren auf immunologischen Methoden, bei denen Antigen-Antikörper-Komplexe auf Objektträgern oder Mikrotiterplatten nachgewiesen werden können (Latex-Agglutinationstest), z. B. Dryspot[®] *Campylobacter*, Oxoid; Slidex[®], Fa. bioMérieux. Zukünftig wird es bei der Identifikation und Typisierung von thermotoleranten *Campylobacter* möglicherweise zu einem verstärkten Einsatz der Fourier-Transformierten Infrarotspektroskopie (FT-IR) kommen (MOUWEN et al., 2005).

Zahlreiche alternative Schnellverfahren zum **Nachweis** von *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln sind kommerziell erhältlich (BAUMGART und BECKER, 2004):

a) Immunologische Verfahren:

ELISA: z. B. EiaFoss *Campylobacter* der Fa. Foss Electric (vollautomatischer Sandwich-ELISA mit paramagnetischen Perlen als Festphase zum Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli*) oder Alert *Campylobacter* der Fa. Neogen (Sandwich-ELISA in Mikrotiterplatte zum Nachweis von *Campylobacter* spp.)

ELFA: z. B. miniVIDAS[®] Campylobacter der Fa. bioMérieux (vollautomatischer Enzyme-linked fluorescent immunoassay mit Pipettenspitze als Festphase zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*)

Immunopräzipitation: z. B. Singlepath[®] Campylobacter der Fa. VWR (Kapillar-Migrations-Test, Antikörper mit farbigen Latexpartikeln oder kolloidalem Gold markiert)

b) Gensonden-Verfahren:

z. B. VIT-Technologie der Fa. Vermicon

z. B. Gene-Probe Accuprobe[®] der Fa. bioMérieux (chemilumineszenzmarkierte Sonde gegen ribosomale RNA zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*) oder Gene-Trak der Fa. R-Biopharm (colorimetrische DNA-RNA-Hybridisierung von rRNA)

c) DNA-Microarray-Technologie:

z. B. NUTRI[®]Chip der Fa. Genescan

d) PCR-Methoden:

Kommerzielle PCR-Systeme enthalten in der Regel einen gebrauchsfertigen Mastermix mit Primern und gegebenenfalls zusätzlich Positiv- und Amplifikationskontrollen:

z. B. SureFood[®] Campylobacter Real-time PCR der Fa. Congen

z. B. artus[®] Campylobacter[™] PCR Kit

z. B. Taqman Campylobacter jejuni und coli Detection Kit der Fa. Applied Biosystems

z. B. BAX[®] Campylobacter jejuni/coli der Fa. DuPont Qualicon.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Studie 1: Vergleich kultureller Verfahren zum Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch

3.1.1 Material

3.1.1.1 Referenzstämme

- *Campylobacter jejuni*, DSM 4688
- *Campylobacter coli*, DSM 4689
- *Campylobacter lari*, DSM 11375
- *Campylobacter upsaliensis*, DSM 5356

3.1.1.2 Probenmaterial

Das Probenkontingent (n = 153) umfasste 61 Proben Geflügelfleisch, 72 Proben Geflügelinnereien und 20 Proben Geflügelfleischzubereitungen in Fertigpackungen aus dem Berliner Groß- und Einzelhandel. Davon waren 89 tiefgefroren und 64 frisch. 7 weitere Proben mit negativem kulturellen Befund konnten aufgrund defekter Prüfmittel (undichte Anaerobiertöpfe) nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Proben wurden in Kühلتaschen mit Gefrier-elementen transportiert und im Labor entsprechend dem Angebotszustand bei – 18 °C bzw. + 2 °C bis zur Untersuchung gelagert. Die Untersuchung erfolgte spätestens drei Tage nach dem Kauf. Tabelle 7 (s. Seite 37) und Abb. 4 geben einen Überblick über das untersuchte Probenmaterial (n = 153), gegliedert nach Angebotszustand und Produkt- sowie Tierart. Im folgenden wird der Begriff „**Geflügelfleischprodukte**“ als Oberbegriff für die Gesamtheit des Probenkontingents, bestehend aus Geflügelfleisch, Geflügelinnereien und Geflügelfleischzubereitungen verwendet.

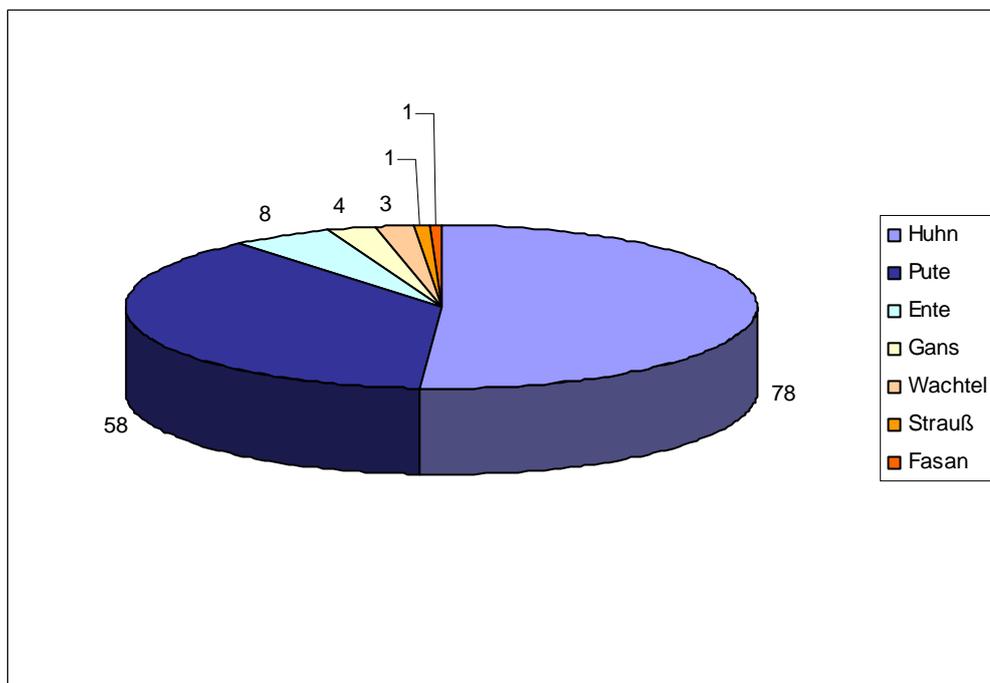


Abb. 4: Probenmaterial (n = 153), gegliedert nach Tierart

3.1.1.3 Nährmedien

- Brucella-Bouillon (Difco)
- Columbia-Agar mit 5 % defibriniertem Schafblut (Oxoid)
- Eisen-Dreizucker-Nährboden (Merck)
- Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar nach Kielwein (GSP) (Merck)
- Karmali-Agar (Oxoid)
- Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel (VD) (Merck)
- mCCD-Agar (mCCDA) (Oxoid)
- Mueller-Hinton-Agar mit 5 % defibriniertem Schafblut (Merck)
- Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid)
- Park und Sanders-Selektivanreicherungsbouillon (Oxoid; Merck).
- Peptonwasser (Merck)
- Plate-Count-Agar (PC) (Merck)
- Preston-Selektivanreicherungsbouillon (Oxoid)
- Standard-Nährboden Nr. 1 (Merck)
- Zitrat-Azid-Tween-Karbonat-Agar (ZATK) (Merck)

Die Nährmedien wurden nach den Herstellerangaben und mit der bei der Nährbodenherstellung üblichen Guten Laborpraxis angefertigt. Die Zusammensetzung der Nährmedien ist im Anhang beschrieben.

Tab. 7: Übersicht über die zur Untersuchung gelangten Produkte

Produktart	Angebotszustand		
	frisch	tiefgefroren	gesamt
Geflügelfleisch	28	33	61
Geflügelfleischzubereitungen	3	17	20
Geflügelinnereien (Leber, Herzen, Mägen)	33	39	72
Σ	64	89	153

3.1.1.4 Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, sind alle verwendeten Reagenzien zur Analyse geeignet. Nicht autoklavierbare Lösungen und Puffer wurden entweder mit sterilem A. dest. angesetzt oder 0,2 µm-sterilfiltriert. Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Lösungen um wäßrige Lösungen (A. dest., steril).

- Bactident® Aminopeptidaseteststäbchen (Merck)
- Bactident® Oxidaseteststäbchen (Merck)
- BBL® Enterotube™ II (Becton-Dickinson)
- Cefalotin-Testblättchen, 30 µg (Oxoid)
- Färbeset Gram-color™ (Merck)

- Indoxylacetatlösung, 10 % (Masse/Volumen) in Aceton (Merck)
- Indoxylacetathydrolyse-Teststreifen (Herstellung: Ein Filterpapier aus Cellulose wurde in 0,7 x 8,0 cm lange Streifen geschnitten, an einem Ende 50 µl einer 10 %igen Indoxylacetatlösung aufgetragen und die Teststreifen mit dem präparierten Ende nach unten in einen leeren Behälter für Oxidaseteststäbchen gegeben. Aufbewahrung bei +4 °C.)
- Kovács Indolreagenz (Merck)
- Nalidixinsäure-Testblättchen, 30 µg (Oxoid)
- Natriumchloridlösung, 0,9 % (Merck)
- Natriumhippuratlösung, 1 % (Masse/Volumen) (Merck)
- Ninhydrinlösung, 3,5 % (Masse/Volumen) in Aceton/Butanol (1:1) (Merck)
- Park und Sanders-Antibiotikallösung A : 0,02 g Vancomycin (Sigma) und 0,02 g Trimethoprim-Laktat (Sigma) in 5 ml 95%igem Ethanol/A. dest. (1:1)
- Park und Sanders-Antibiotikallösung B : 0,032 g Cefoperazon (Sigma) und 0,1 g Cycloheximid (Sigma) in 5 ml A. dest./Aceton (1:1)
- Wasserstoffperoxidlösung, 3 % (Masse/Volumen) (Merck)

3.1.1.5 Geräte und Hilfsmittel

- Anaerobierindikator™ (Oxoid)
- Anaerobier-Topf, AnaeroJar™ (Oxoid)
- Anaero Gen™ (Oxoid)
- Bagpage® Filterbeutel 180/300 (Interscience, über Migge Laborbedarf GmbH)
- Beutelwalkmischer Stomacher 40 (Colworth)
- Brutschränke (25°C, 30°C, 32°C, 37°C, 42°C, 43°C) (Heraeus)
- Einmal-Impfösen, 10 µl (Migge Laborbedarf GmbH)
- Filterpapier aus Cellulose (Schleicher und Schuell)
- Gaserzeugungs-Kit Campy Gen™ (Oxoid)
- Hohlschliffobjektträger (Migge Laborbedarf GmbH)
- Kryoblock (Mast Diagnostika GmbH)
- Laborwaage, Ablesegenauigkeit 1 g (Sartorius)
- Mikrobank™ (Mast Diagnostika GmbH)
- Roticlip 190 (Carl Roth GmbH)
- Schere und Pinzette zur Gewebezerkleinerung (Migge Laborbedarf GmbH)
- Sicherheitsreaktionsgefäße SafeSeal Microcentrifuge Tubes 2,0 ml (Carl Roth GmbH)
- sterile Glasspatel (Migge Laborbedarf GmbH)
- Tiefkühltruhe, -79 °C (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Tripovac Siegelrandbeutel 130/220 (Schaub & Co)
- Whirl-Mix VF2 (Fa. Jankel & Kunkel, IKA® Labortechnik)

3.1.2 Methodik - Durchführung

3.1.2.1 Zielsetzung der Versuche

In der vorliegenden Studie sollten durch die Untersuchung von natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten mit den in der ISO 10272:1995 (E) beschriebenen kulturellen Anreicherungsverfahren folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Werden mit dem Anreicherungsprotokoll nach Preston bzw. Park und Sanders unterschiedliche Isolierungsraten bei natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten, auch unter Berücksichtigung von Produktart und Angebotszustand, erzielt?
- Hat die Dauer der Inkubation der Anreicherungsmedien (24 h oder 48 h) einen Einfluss auf die Nachweisraten?
- Besteht die Notwendigkeit einer Blutsupplementation des Flüssigmediums nach Preston?
- In welchem Ausmaß sind frische und tiefgefrorene Geflügelfleischprodukte im Berliner Einzelhandel qualitativ und quantitativ mit *Campylobacter* belastet?

Neben den vergleichenden Untersuchungen zum qualitativen Nachweis wurde eine Bestimmung der *Campylobacter*-Keimzahl mittels eines semiquantitativen Titerverfahrens und eines direkten Zählverfahrens durchgeführt. Zudem wurde der mikrobiologische Status der Geflügelfleischprodukte mittels der Parameter mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden, Enterobakteriaceen und Enterokokken unter Anwendung des Tropfplattenverfahrens ermittelt.

3.1.2.2 Herstellung der Untersuchungsprobe

Um für die parallelen Versuchsansätze eine homogene Ausgangssuspension zu erhalten, wurde abweichend von der in der ISO 10272:1995 (E) beschriebenen destruktiven Probenahme ausschließlich mit Spülproben gearbeitet. Tiefgefrorene Proben wurden vor der Untersuchung über Nacht bei + 4 °C angetaut.

Von jeder Probe wurden 200 g in einen sterilen Stomacherbeutel mit Filtereinsatz (Bagpage[®], Interscience) eingewogen und mit Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid) im Verhältnis 1:1 versetzt. Anschließend wurde der Beutel unter Minimierung des verbleibenden Luftraums mit einem Clip verschlossen und die Probe 60 Sekunden mit der Hand abmassiert. Die so erhaltene Suspension, im Weiteren als **Spülflüssigkeit** bezeichnet, wurde vollständig durch den Filtereinsatz des Stomacherbeutels in einen weiteren sterilen Stomacherbeutel überführt, unter Minimierung des verbleibenden Luftraums mit einem Clip verschlossen und maximal 10 min bis zur weiteren Verwendung zurückgestellt.

3.1.2.3 Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Campylobacter* in natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten

25 ml der Spülflüssigkeit wurden nach sorgfältiger Durchmischung auf jeden der bereitstehenden Parallelansätze verteilt. Die 5 Parallelansätze wurden entsprechend den Fragestellungen modifiziert hergestellt: je zwei Ansätze mit Preston- und mit Park und Sanders-Selektivanreicherungsmedium sowie ein Ansatz mit Preston-Selektivanreicherungsmedium ohne Zusatz von lysiertem Pferdeblut. Der Versuchsaufbau einschließlich der Inkubationsschritte und -bedingungen ist in Abbildung 5 (s. Seite 40) dargestellt.

Die Selektivanreicherung nach Park und Sanders wurde mehrstufig supplementiert und inkubiert. Die mikroaerobe Inkubation (85 % N₂, 10 % CO₂ und 5 % O₂) erfolgte mit Hilfe von Anaerobiertöpfen (AnaeroJar[™], CampyGen[™], Oxoid). Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Testsystems wurde in jedem Anaerobiertopf eine Plattenkultur des Referenzstamms *Campylobacter coli* DSM 4689 auf Columbia-Blut-Agar als Positivkontrolle mitgeführt. Es wurden nur solche Ergebnisse in die Auswertungen einbezogen, bei de-

nen der Teststamm korrekt angewachsen war. Die Selektivanreicherungsmedien und Selektivnährböden (Charge) wurden einer Sterilitäts- und Funktionskontrolle unterzogen.

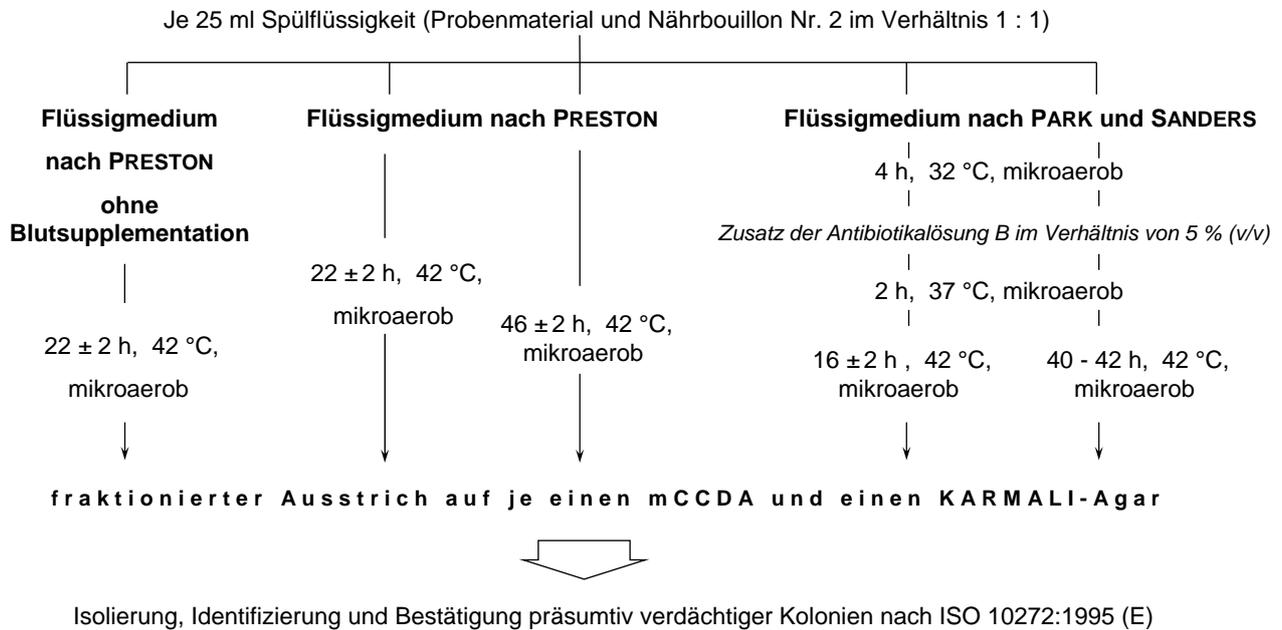


Abb. 5: Versuchsaufbau Studie 1 (Fließdiagramm)

Im Anschluss an die Bebrütung wurden alle Flüssigkulturen mit einer 10 µl-Einmal-Impföse auf je einen mCCDA und einen Karmali-Agar fraktioniert ausgestrichen. Die Plattenkulturen wurden nach 48-stündiger, mikroaerober Bebrütung bei 42 °C auf verdächtige, Oxidase-positive Kolonien untersucht. Die thermotoleranten *Campylobacter* spp. bilden auf dem mCCDA und dem Karmali-Agar - beeinflusst durch die Feuchtigkeit des Nährmediums - graue bis metallisch glänzende, flache, amorphe Kolonien mit Ausbreitungstendenz oder runde, flache bis konvexe Einzelkolonien mit einem Durchmesser von 1 – 2 mm.

Für die weitere Identifizierung und Bestätigung wurden verdächtige Einzelkolonien auf Columbia-Blut-Agar subkultiviert und 48 h bei 42 °C mikroaerob bebrütet. Die Reinkulturen wurden anschließend mit Hilfe der folgenden Identifizierungsreaktionen der Gattung *Campylobacter* zugeordnet:

- Gram-Färbung: Die Gram-Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Grampräparat erscheinen *Campylobacter* spp. als gramnegative, dünne, komma-, spiral- bzw. s-förmige Stäbchen.
- Beweglichkeit im „Hängenden Tropfen“: Dazu wurde eine geringe Menge Koloniematerial von frischen Reinkulturen auf dem Columbia-Blut-Agar in Brucella-Bouillon suspendiert und 4 h bei 42 °C mikroaerob bebrütet. Ein Tropfen dieser Flüssigkultur wurde auf ein Deckgläschen verbracht und über einem Hohlsliffobjektträger hängend betrachtet. *Campylobacter* spp. weisen eine gerichtete, korkenzieherartige Beweglichkeit auf.
- Cytochromoxidase-Nachweis: Eine Kolonie wurde mittels einer Impföse auf der Reaktionszone eines kommerziellen Oxidase-Teststäbchens verrieben. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben. *Campylobacter* spp. reagieren Oxidase-positiv.
- Wachstum in einer aeroben Atmosphäre: Zusätzlich zu den Vorgaben der ISO 10272:1995 (E) wurden die Isolate auf ihre Fähigkeit überprüft, unter aeroben Bedingungen zu wachsen. Hierzu wurde eine Ko-

lonie auf zwei Columbia-Blut-Agar-Platten subkultiviert und je eine Subkultur 48 h bei 42 °C aerob bzw. mikroaerob bebrütet. *Campylobacter* spp. zeigen unter aerober Bebrütung kein Wachstum.

- Wachstum bei 25 °C: Hierzu wurde eine Kolonie auf einen Columbia-Blut-Agar fraktioniert ausgestrichen und 48 h bei 25 °C mikroaerob bebrütet. Thermotolerante *Campylobacter* spp. zeigen bei 25 °C unter mikroaerober Bebrütung kein Wachstum.
- Wachstum auf Eisen-Dreizucker-Agar: Ein Eisen-Dreizucker-Schrägagar wurde auf der Oberfläche und im Stich beimpft und bis zu 72 h bei 42 °C mikroaerob bebrütet. Die Bewertung der Reaktionen wurde dabei wie folgt durchgeführt:

Hochschicht	gelb	glucosepositiv (Glucosevergärung)
	rot oder unverändert	glucosenegativ (keine Glucosevergärung)
	schwarz	Bildung von Schwefelwasserstoff (H ₂ S)
	Blasen oder Spalten	Gasbildung aus Glucose
Schrägfläche	gelb	lactose- und/oder saccharosepositiv (Zuckerabbau)
	rot oder unverändert	lactose- und/oder saccharosenegativ (kein Zuckerabbau)

Campylobacter spp. bauen Glucose, Saccharose und Lactose weder oxidativ noch fermentativ ab, bilden kein Gas und mit Ausnahme einiger Stämme von *C. coli* auch keinen Schwefelwasserstoff.

Abschließend erfolgte die Differenzierung thermotoleranter *Campylobacter* auf Speziesebene. Das Wachstumsverhalten und die biochemischen Eigenschaften wurden wie folgt überprüft und bewertet:

- Katalasenachweis: Einzelkolonien vom Eisen-Dreizucker-Agar oder erforderlichenfalls von einer weiteren Subkultur auf Standard I-Nähragar wurden auf einen Objektträger übertragen und mit einem Tropfen 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung überschichtet. Der Test wurde als positiv gewertet, wenn innerhalb von 30 Sekunden Blasen auftraten.
- Resistenzverhalten gegenüber Nalidixinsäure und Cefalotin: Eine geringe Menge Koloniematerial von einer frischen Plattenkultur auf Columbia-Blut-Agar wurde in 2 ml Brucella-Bouillon suspendiert und gründlich durchmischt. Je 0,1 ml dieser Suspension wurden auf zwei Mueller-Hinton-Blutagarplatten gleichmäßig ausgespatelt. Die beimpften Nährböden wurden ca. 5 min lang im Brutschrank bis zur vollständigen Abtrocknung der Agaroberfläche inkubiert. Anschließend wurde je ein Testblättchen mit Nalidixinsäure (30 µg) und Cefalotin (30 µg) auf die Oberfläche aufgebracht und der Nährboden abschließend 24 h bei 37 °C mikroaerob bebrütet. Beim Vorliegen einer Wachstumshemmzone jeglicher Größe wurde der getestete Stamm als sensibel gegenüber dem jeweiligen Antibiotikum eingestuft.
- Nachweis der Hippurathydrolyse: Eine volle Impföse Koloniematerial von einer frischen Plattenkultur auf Columbia-Blut-Agar wurde in 0,4 ml einer 1 %igen Natriumhippuratlösung suspendiert und nach gründlicher Durchmischung 2 h bei 37 °C im Wasserbad bebrütet. Anschließend wurde die Suspension mit 0,2 ml einer 3,5 %igen Ninhydrinlösung überschichtet und weitere 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Beim Eintritt einer tiefblau-violetten Verfärbung wurde die Reaktion als positiv bewertet.
- Nachweis der Indoxylacetathydrolyse: Zusätzlich zu den Vorgaben der ISO 10272:1995 (E) wurden die Isolate auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von Indoxylacetat nach POPOVIC-UROIC et al. (1990) untersucht. Hierzu wurde eine volle Impföse Koloniematerial von einer frischen Columbia-Blut-Agarkultur auf die zuvor mit einem Tropfen sterilem Aqua dest. befeuchtete Reaktionsfläche eines Indoxylacetat-Testplättchens verrieben. Die Reaktion wurde als positiv bewertet, wenn sich die Reaktionszone innerhalb von 5 bis 10 min tiefblau verfärbte.

Die Spezieszuordnung erfolgte anhand der in der folgenden Tabelle 8 dargestellten Differenzierungsmerkmale. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der verwendeten Reagenzien und Nährmedien wurden für jedes Testsystem eine Positivkontrolle mit dem Referenzstamm *C. coli* DSM 4689 sowie eine Negativkontrolle mitgeführt.

Tab. 8: Differenzierungsmerkmale zur Speziesdifferenzierung (modifiziert nach ISO 10272:1995 (E))

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Katalase	+	+	+	s/-
H ₂ S-Produktion (TSI)	-	s ^{TSI}	-	-
Hippurat-Hydrolyse	+	-	-	-
Indoxylacetat-Hydrolyse	+	+	-	+
Empfindlichkeit gegenüber				
Cephalothin	R	R	R	S
Nalidixinsäure	S	S	v	S

Legende: + = positiv / - = negativ / s = leicht positiv / s^{TSI} = leichte H₂S-Entwicklung im Kondenswasser nach 5 Tagen /
v = variabel / R = resistent / S = sensitiv

3.1.2.4 Quantitative und semiquantitative Bestimmung der *Campylobacter* Keimzahlen

Die Anwendung des **Titerverfahrens** ermöglicht eine semiquantitative Abschätzung der *Campylobacter*-Keimzahlen. Dazu wurde die Selektivanreicherungsbouillon nach Park und Sanders mit unterschiedlichen Probenmengen (10 ml, 1 ml, 0,1 ml) der Spülflüssigkeit nach Abschnitt 3.1.2.2 versetzt und mikroaerob bebrütet. Die Isolierung, Identifizierung und abschließende Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgte in Anlehnung an ISO 10272:1995 (E) entsprechend dem Abschnitt 3.1.2.3.

Für die **Keimzahlbestimmung mittels Spatelverfahren** wurde 0,1 ml der Spülflüssigkeit mit einer sterilen Pipette auf einen mCCDA aufgetragen und mit sterilem Glasspatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nach 48-stündiger, mikroaerober Bebrütung der Plattenkulturen bei 42 °C wurden verdächtige, Oxidase-positive Kolonien ausgezählt. Die weitere Isolierung, Identifizierung und abschließende Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgte gemäß Abschnitt 3.1.2.3.

Die ermittelten Koloniezahlen beziehen sich auf eine Impfmenge von 0,1 ml Spülflüssigkeit. Durch Multiplikation der Koloniezahl mit dem Faktor 10 wurden die Keimzahlen je Milliliter Spülflüssigkeit [KbE/ml] berechnet. Um die Keimzahlen auf der gesamten Produktoberfläche zu erhalten, wurden die auf einen Milliliter Spülflüssigkeit bezogenen Keimzahlen mit dem Faktor 200, entsprechend dem Volumen der Spülflüssigkeit, multipliziert.

3.1.2.5 Bestimmung des mikrobiologischen Status

Geflügelfleischprodukte sind häufig in hohem Maße mit einer gram-negativen Begleitflora, insbesondere Enterobakteriazeen und Pseudomonaden, belastet. Um einen möglichen Einfluss auf den Nachweis von *Campylobacter* spp. darstellen zu können, wurde der mikrobiologische Status der Geflügelfleischprodukte mittels der Parameter mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und Enterokokken unter Anwendung des Tropfplattenverfahrens bestimmt. Dazu wurde 1 ml der Spülflüssigkeit durch sterile Gaze filtriert und eine dezimale Verdünnungsreihe in Höhe der zu erwartenden Keimzahlen hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 0,05 ml auf einen entsprechenden Sektor des Nährbodens aufgetragen und mit der Pipettenspitze verteilt (drop plating). Die verwendeten Nährböden und die jeweiligen Inkubationsbedingungen sind aus Tabelle 9 ersichtlich. Die Nährböden wurden vor ihrer Verwendung einen Tag bei Raumtemperatur vorgetrocknet.

Tab. 9: Verwendete Nährböden und Inkubationsbedingungen

Ziel-Mikroorganismen	Nährböden	Inkubationsbedingungen		
		Dauer [in h]	Temp. [in °C]	Atmosph.
mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	Plate-Count-Agar (PC)	72±2	30	aerob
Pseudomonaden	Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar nach Kielwein (GSP)	46±2	30	aerob
Enterobakteriazeen	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Nährboden (VG)	46±2	30	anaerob
Enterokokken	Zitrat-Azid-Tween-Karbonat-Selektivnährboden (ZATK)	46±2	37	aerob

Die Identifikation und Bestätigung verdächtiger Kolonien auf PC, VG und ZATK erfolgte entsprechend den Normen L 06.00-35, L 06.00-25 und L 06.00-32 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (jetzt: § 64 LFGB). Bläulich schimmernde Kolonien in rotvioletter Umgebung auf GSP-Agar mit einem Durchmesser von bis zu 2,5 mm, welche Katalase- und Oxidase-positiv reagierten, wurden als Pseudomonaden definiert.

Die Keimzahlen [KbE/ml Spülflüssigkeit] wurden über das gewogene arithmetische Mittel der Koloniezahlen gemäß den oben genannten Prüfverfahren berechnet.

Für die Daten der mikrobiologischen Stuserhebung wurden die Kenngrößen Median, arithmetisches Mittel, Standardabweichung sowie erstes und drittes Quartil berechnet.

3.2 Studie 2: Vergleich zweier PCR-Systeme für das Screening auf thermotolerante *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch

3.2.1 Material

3.2.1.1 Referenzstämme

Für die eigenen Untersuchungen wurden die folgenden Referenzstämme von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig verwendet:

- *Campylobacter coli*, DSM 4689 (= ATCC 33559)
- *Campylobacter jejuni*, DSM 4688 (= ATCC 33560)

3.2.1.2 Probenmaterial

- 80 Proben tiefgefrorenes (n = 54) und frisches (n = 26) Geflügelfleisch in Fertigpackungen aus dem Berliner Groß- und Einzelhandel
- Transport in Kühltaschen mit Gefrierenlementen und Aufbewahrung aller Proben entsprechend dem Angebotszustand bei – 18 °C (TK-Ware) bzw. + 2 °C (Frische gekühlte Produkte) bis zum Untersuchungsbeginn (spätestens am dritten Tag ab Kaufdatum)

3.2.1.3 Nährmedien

- Entspricht 3.1.1.3

3.2.1.4 Reagenzien

Bakteriologie:

- Entspricht 3.1.1.4

DNA-Extraktion:

- DNeasy™ Tissue Kit (69506, Qiagen GmbH)
- Ethanol für Molekularbiologie (E-7023, Sigma)
- Waschpuffer AW1, Konzentrat (19081, Qiagen GmbH)
- Waschpuffer AW2, Konzentrat (19072, Qiagen GmbH)
- TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer, pH = 8,0 ± 0,1), Zusammensetzung: 10 mM Tris/HCl (T-5941, Sigma) und 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-di-Natriumsalz (T-5134, Sigma) in Aqua dest.
- Elutionspuffer AE (19077, Qiagen GmbH)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

- Aqua bidestillata, steril
- Bovines Serum Albumin, azetyliert, $\rho = 20$ mg/ml (B-8894, Sigma)
- PCR-Pufferlösung (10fach), Zusammensetzung (1-fach): 10 mM Tris-HCl (pH = 8,8 bei 25 °C) und 50 mM KCl und 0,1% Triton X-100 (DyNAzyme™ Buffer F-510S, Finnzymes Oy)

- MgCl₂-Lösung, c = 50 mM (F-510S, Finnzymes Oy)
- PCR-Pufferlösung (10fach), Zusammensetzung (1-fach): 10 mM Tris-HCl (pH = 8,8 bei 25 °C) und 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl und 0,1% Triton X-100 (DyNAzyme™ Optimized Buffer F-511S, Finnzymes Oy)
- Desoxynukleosid-triphosphat (dNTP)-Lösung, Zusammensetzung: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (F-560L, Finnzymes Oy)
- Primer nach WEGMÜLLER et al. (1993), 0,1 mM (Synthese durch biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen):
CF03 (5'-GCT CAA AGT GGT TCT TAT GCA ATG G-3')
CF04 (5'-GCT GCG GAG TTC ATT CTA AGA CC-3')
Seminested Primer Set:
CF03 und CF02 (5'-AAG CAA GAA GTG TTC CAA GTT T-3')
- Primer nach OYOFO et al. (1992), 0,1 mM (Synthese durch biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen):
pg50 (5'-ATC GGA TTT CGT ATT AAC-3')
pg3 (5'-GAA CTT GAA CCG ATT TG-3')
- DNA-Polymerase, 2 U/μl (DyNAzyme™, Finnzymes Oy)
- Mineralöl (M-8662, Sigma)

DNA-Gelelektrophorese:

- TBE-Pufferlösung (Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH = 8,0 ± 0,1),
Zusammensetzung: 90 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (T-8524, Sigma), 90 mM Borsäure (T-6768, Sigma) und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-di-Natriumsalz (T-5134, Sigma) in A. bidest.
Die Elektrophorese-Pufferlösung wurde als 10fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert.
- Agarose-Gel, Zusammensetzung: Agarose I™ (230-710, Biometra), ρ = 15 g/l und Ethidiumbromid (111615, Merck), ρ = 0,5 mg/l in TBE-Pufferlösung
- Elektrophorese-Pufferlösung (Laufpuffer), Zusammensetzung: TBE-Pufferlösung mit Ethidiumbromid (111615, Merck), ρ = 0,5 mg/l
- Geltaschen-Pufferlösung, Zusammensetzung: Ficoll 400 (amersham pharmacia biotech), ρ = 150 g/l und Bromphenolblau (Amersham Pharmacia Biotech), ρ = 2,5 g/l in TBE-Pufferlösung
- DNA-Molekulargewichtsmarker Low-Ladder, 100 bp und 20 bp (P-1473, P-1598, Sigma)
- Ethidiumbromid-Destain-Bags (211-732, Biometra)

Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen wurden ausschließlich Reagenzien verwendet, die „für die Molekularbiologie geeignet“ sind. Nicht autoklavierbare Lösungen und Puffer wurden mit sterilem A. bidest. angesetzt. Die für die PCR erforderlichen Reaktionslösungen wurden in der Regel aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Bakteriologie:

- Entspricht 3.1.1.5

DNA-Extraktion:

- Mikrozentrifuge 5415C für Mikroliterreaktionsgefäße (Eppendorf)
- Mikroliterpipette (Eppendorf)
- Collection Tubes 2,0 ml (Qiagen GmbH)

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) :

- Wasserbad oder Thermoblock (bis 100°C)
- Thermomixer 5437 (Eppendorf)
- Mikrozentrifuge 5415C für Mikroliterreaktionsgefäße (Eppendorf)
- Sicherheitsreaktionsgefäße SafeSeal Microcentrifuge Tubes 2,0 ml (Roth)
- Multi Ultra PCR Tubes® 0,2 ml (Roth)
- Positive-Displacement-Pipette Eppendorf Biomaster 4830 mit zugehörigen Mastertips (Eppendorf)
- Pipette Reference®, Filtertips (Eppendorf)
- Acrylglas-Cooler für PCR-Gefäße (Migge Laborbedarf)
- Eis, Thermoblock
- Trio-Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra)

DNA-Gelelektrophorese:

- Apparatur für eine horizontale Gelelektrophorese, bestehend aus Gelelektrophosekammer Agargel G45 mit Zubehör und Netzgerät Standard Power Pack P25 (Biometra)
- Transilluminator TI 1 (Biometra)
- Videodokumentationssystem BioDocAnalyze™ mit Software ScanPack™ 2.0 (Biometra)
- Polaroidkamera CU-5 mit Wechseltubus GH20, Polaroid-Sofortbildfilm Typ 667 (Biometra). Die Aufnahmen erfolgten mit Blende 22 und Orange-Filter bei einer Belichtungszeit von 1 sec.

3.2.2 Methodik - Durchführung

3.2.2.1 Versuchsaufbau

80 frische und tiefgefrorene Geflügelfleisch-Proben aus dem Berliner Groß- und Einzelhandel wurden kulturrell nach ISO 10272:1995 (E) und parallel dazu mit zwei PCR-Systemen auf das Vorkommen von thermotoleranten *Campylobacter* spp. untersucht. Einen Überblick über den Untersuchungsgang gibt Abb. 6. Im Rahmen des Anreicherungsverfahrens wurde das Selektivanreicherungsmedium nach Preston verwendet. Wesentliche Kennzeichen der verwendeten PCR-Systeme sind in Tab. 10 (s. Seite 50) dargestellt.

3.2.2.2 Herstellung der Untersuchungsprobe

Von jeder Probe wurden 50 g in einen sterilen Stomacherbeutel mit Filtereinsatz (Bagpage[®], Interscience) eingewogen und mit Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid) im Verhältnis 1:1 versetzt. Anschließend wurde der Beutel unter Minimierung des verbleibenden Luftraums mit einem Clip verschlossen und die Probe 60 Sekunden mit der Hand abmassiert. Die so erhaltene Suspension (Spülflüssigkeit) wurde vollständig durch den Filtereinsatz des Stomacherbeutels in einen weiteren sterilen Stomacherbeutel überführt, unter Minimierung des verbleibenden Luftraums mit einem Clip verschlossen und maximal 10 min bis zur weiteren Verwendung zurückgestellt.

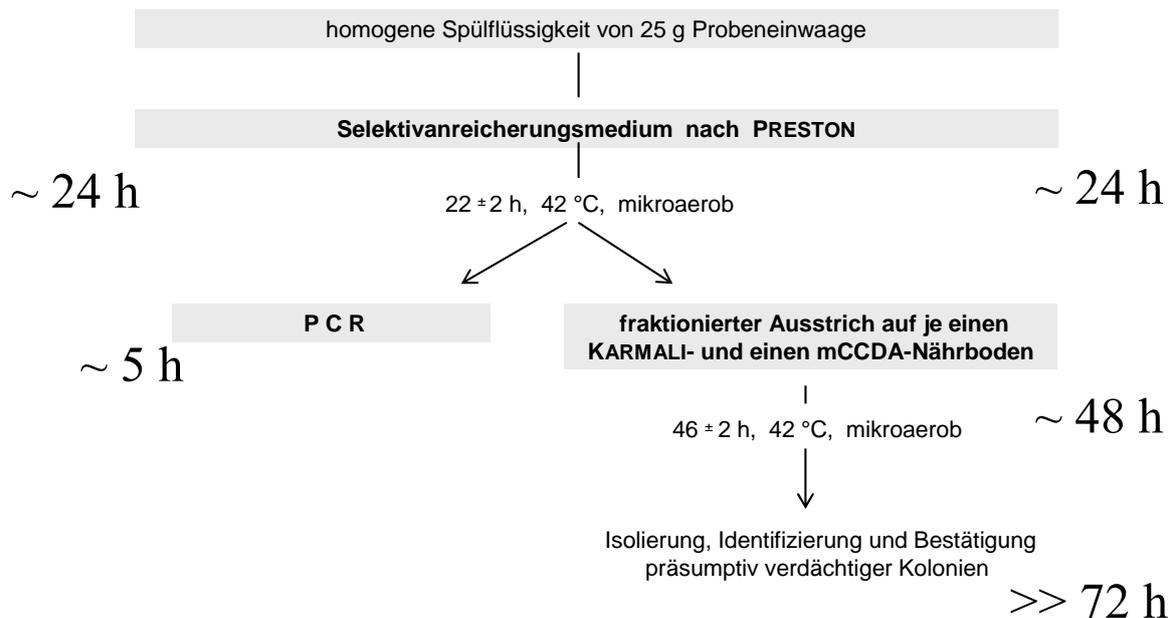


Abb. 6: Versuchsaufbau Studie 2 (Fließdiagramm)

3.2.2.3 Kultureller Nachweis von *Campylobacter* spp.

25 ml der Spülflüssigkeit wurden nach sorgfältiger Durchmischung in Preston-Bouillon überführt und für 24 h bei 42 °C mikroaerob bebrütet. Anschließend wurden 10 µl der inkubierten Flüssigkultur auf mCCDA und Karmali-Agar ausgestrichen und für 48 h bei 42 °C mikroaerob inkubiert. Die Isolierung, Identifizierung und abschließende Bestätigung von *Campylobacter* erfolgte gemäß ISO 10272:1995 (E) (vgl. Abschnitt 3.1.2.3).

3.2.2.4 Molekularbiologischer Nachweis von *Campylobacter* spp. mit der Polymerase-Kettenreaktion

3.2.2.4.1 Herstellung der *Campylobacter*-Referenz-DNA

Ausreichend Koloniematerial des Referenzstammes *C. coli* DSM 4689 wurde in 200 µl PCR-Puffer suspendiert, 5 min bei 100 °C gekocht und 1 min bei 13000 g zentrifugiert. Für den Einsatz als *Campylobacter*-Referenz-DNA wurde der Überstand so weit verdünnt, bis im Anschluss an den PCR-Lauf gerade noch eine schwache Bande im Agarosegel sichtbar war. Die verdünnte DNA-haltige Lösung wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.4.2 Aufbereitung der Proben

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte mit dem DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aus 1 ml der inkubierten Preston-Bouillon. Sie wurde entsprechend den Herstellerangaben nach dem Protokoll für die Isolierung genomischer DNA aus gramnegativen Bakterien durchgeführt. Bei diesem Protokoll erfolgt die DNA-Extraktion durch enzymatische Lyse der Bakterien mittels Proteinase K und anschließende Fällung der Nukleinsäuren mit 96 %igem Ethanol. Die DNA-Reinigung beruht auf der spezifischen Bindung der Nukleinsäuren an eine Silicamembran unter definierten Bedingungen im Extraktionsansatz.

3.2.2.4.3 Seminested PCR mit den Primerpaaren CF03/CF04 und CF03/CF02

Beide Schritte des erstmals von WEGMÜLLER et al. (1993) vorgestellten seminested PCR-Systems (snPCR) wurden in einem 25 µl-Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung (Endkonzentration im Reaktionsansatz) durchgeführt: 1-fach PCR-Puffer (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1 % Triton X-100), 4 mM MgCl₂, Bovines Serum Albumin, azetyliert ($\rho = 2,0 \times 10^{-3}$ g/l), 0,2 mM dNTP (jeweils), 0,25 µM CF03, 0,25 µM CF04 bzw. CF02 und 0,5 U thermostabile DNA-Polymerase.

Der Anzahl an Reaktionsansätzen entsprechend wurde ein Mastermix hergestellt („auf Eis“), kurz anzentrifugiert und zu je 24 µl auf die entsprechenden Reaktionsansätze verteilt. Das Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix ist in Tabelle 11 (s. Seite 51) dargestellt.

Die Probenansätze für die PCR mit dem äußeren Primerpaar CF03/CF04 wurden mit 1 µl des Nukleinsäureextraktes nach Abschnitt 3.2.2.4.2 vervollständigt. Die Probenansätze für die PCR mit dem inneren Primerpaar CF03/CF02 wurden mit 1 µl Reaktionsgemisch aus dem ersten PCR-Ansatz komplettiert.

Um die einwandfreie Funktion der Polymerase-Kettenreaktion zu bestätigen, wurde bei jedem PCR-Lauf eine Positivkontrolle (syn. Positive-PCR-Kontrolle) und mindestens eine Negativkontrolle (syn. Negative-PCR-Kontrolle bzw. Reagenzienkontrolle) mitgeführt. Dem Positivkontrollansatz wurde 1 µl der *Campylobacter*-Referenz-DNA zugefügt. Die als Reagenzienkontrolle dienenden Ansätze wurde mit 1 µl sterilem A. bidest. komplettiert. Um falsch negative Ergebnisse aufgrund PCR-inhibierender Einflüsse durch die Nukleinsäureextrakte nach Abschnitt 3.2.2.4.2 auszuschließen, wurden externe (homologe) Amplifikationskontrollen in getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Als Template wurde 1 µl der *Campylobacter*-Referenz-DNA eingesetzt.

Abschließend wurden alle PCR-Ansätze mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die thermozyklischen Reaktionen wurden nach den folgenden Temperatur-Zeit-Programmen durchgeführt, die denen in der Originalarbeit entsprechen:

PCR mit dem äußeren Primerpaar CF03/CF04:

- Initiale Denaturierung der DNA: 5 min bei 94 °C
- 20-malige zyklische Wiederholung des folgenden Temperatur-Zeit-Profiles:
 - Denaturierung 5 sec bei 95,5 °C,
 - Anealing 30 sec bei 53 °C,
 - Elongation 40 sec bei 72 °C
- Die abschließende Elongation erfolgte für 3 min bei 72 °C.
- Bis zur weiteren Verwendung wurden die Reaktionsansätze bei 4 °C aufbewahrt.

PCR mit dem inneren Primerpaar CF03/CF02:

- Initiale Denaturierung der DNA: 2,5 sec bei 94 °C
- 40-malige zyklische Wiederholung des folgenden Temperatur-Zeit-Profiles:
 - Denaturierung 5 sec bei 95,5 °C,
 - Anealing 30 sec bei 53 °C,
 - Elongation 40 sec bei 72 °C
- Die abschließende Elongation erfolgte für 3 min bei 72 °C.
- Bis zur weiteren Verwendung wurden die Reaktionsansätze bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.4.4 PCR mit dem Primerpaar pg50/pg3 (OYOFO et al., 1992)

Die Amplifikationsreaktionen des zweiten PCR-Systems wurden ebenfalls in einem 25 µl-Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung (Endkonzentration im Reaktionsansatz) durchgeführt: 1-fach PCR-Puffer (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1 % Triton X-100), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (jeweils), 0,5 µM pg50, 0,5 µM pg3 und 1 U thermostabile DNA-Polymerase.

Der Anzahl an Reaktionsansätzen entsprechend wurde ein Mastermix hergestellt („auf Eis“), kurz anzentri-fugiert und zu je 24 µl auf die entsprechenden Reaktionsansätze verteilt. Das Pipettierschema zur Her-stellung des Mastermix ist in Tabelle 12 (s. Seite 51) dargestellt. Die Probenansätze wurden mit 1 µl des Nu-kleinsäureextraktes nach Abschnitt 3.2.2.4.2 vervollständigt.

Um die einwandfreie Funktion der Polymerase-Kettenreaktion zu verifizieren, wurde bei jedem PCR-Lauf eine Positivkontrolle (syn. Positive-PCR-Kontrolle) und mindestens eine Negativkontrolle (syn. Negative-PCR-Kontrolle bzw. Reagenzienkontrolle) mitgeführt. Dem Positivkontrollansatz wurde 1 µl der *Campylo-bacter*-Referenz-DNA zugefügt. Die als Reagenzienkontrolle dienenden Ansätze wurde mit 1 µl sterilem A. bidest. komplettiert. Um falsch negative Ergebnisse aufgrund PCR-inhibierender Einflüsse durch die Nukleinsäureextrakte nach Abschnitt 3.2.2.4.2 auszuschließen, wurden externe (homologe) Amplifikati-onskontrollen in getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Als Template wurde 1 µl der *Campylobacter*-Referenz-DNA eingesetzt.

Abschließend wurden alle PCR-Ansätze mit 10 µl Mineralöl überschichtet. Die thermozyklische Reaktion wurde nach dem folgenden Temperatur-Zeit-Programm durchgeführt:

- Initiale Denaturierung der DNA: 5 min bei 94 °C
- 40malige zyklische Wiederholung des folgenden Temperatur-Zeit-Profiles:
 - Denaturierung 30 sec bei 94 °C,
 - Anealing 60 sec bei 42 °C,
 - Elongation 30 sec bei 72 °C
- Die abschließende Elongation erfolgte für 5 min bei 72 °C.
- Bis zur weiteren Verwendung wurden die Reaktionsansätze bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.4.5 Nachweis der PCR-Produkte

Die Detektion der Amplifikate erfolgte mittels Gelelektrophorese im ethidiumbromidgefärbten 1,5 %igen Agarosegel. 5 µl DNA-Molekulargewichtsmarker wurden mit 1 µl Geltaschen-Pufferlösung gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Ebenso wurden 10 µl der Lösung mit den PCR-Produkten bzw. der Kontrollenansät-ze mit 2 µl Geltaschen-Pufferlösung versetzt und parallel zu dem DNA-Molekulargewichtsmarker elek-trophoretisch aufgetrennt (Elektrophorese: Raumtemperatur, 90 min, 100 V). Die im elektrischen Feld auf-

getrennten PCR-Produkte wurden anschließend im Transilluminator unter UV₃₁₂-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Durch visuellen Vergleich der Wanderungstrecke des DNA-Molekulargewichtsmarkers mit denen der Amplifikate wurde die Fragmentlänge der PCR-Produkte geschätzt.

Die Amplifikation mit dem Primerpaar CF03/CF04 erbringt PCR-Produkte mit einer Fragmentlänge von 340 bis 380 Basenpaaren (bp). Eine Verifikation des CF03/CF04-Amplifikats im Sinne der DIN 10134:1998 erfolgte durch den zweiten Amplifikationsschritt der seminested PCR, bei dem das innere Primerpaar CF03/CF02 spezifisch an das erste Amplifikat bindet. Mit dem Primerpaar CF03/CF02 entstehen Amplifikate mit einer Fragmentlänge von 180 bis 220 bp (WEGMÜLLER et al., 1992).

Bei dem pg50/pg3-System wird ein PCR-Produkt mit einer Länge von 450 Basenpaaren erwartet. Die von OYOFO et al. (1992) publizierte Southernblot-Hybridisierung der Amplifikate mit einer spezifischen DNA-Sonde wurde nicht durchgeführt. Die mit dem pg50/pg3-System untersuchten Proben wurden nur dann als richtig positiv gewertet, wenn parallel mit dem kulturellen Verfahren nach ISO 10272:1995 (E) *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden konnten (vgl. DIN EN ISO 20838:2006, Abschnitt 7.2, Satz 5).

3.2.2.4.6 Bewertung

Ein positives PCR-Ergebnis wurde durch den Nachweis eines PCR-Produktes mit der erwarteten Länge in der Gelelektrophorese, ein negatives Ergebnis durch das Fehlen desselben definiert, unter der Voraussetzung, dass die externe Amplifikationskontrolle sowie die Negativ- und Positivkontrolle die erwarteten Ergebnisse erbrachten.

Tab. 10: Ausgewählte Kennzeichen der beiden PCR-Systeme

Spezies Zielgen	Primer Amplifikatgröße (bp)	Anealingtemp. [°C]	Referenz
<i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i> flaA- und flaB-Gen	CF03, CF04 340-380	53	WEGMÜLLER et al. (1993)
	CF03, CF02 180-220	53	
<i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i> flaA-Gen	pg50, pg3 450	42	OYOFO et al. (1992)

Tab. 11: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix des CF03/CF04-PCR-Systems

Komponente	Gehalt der Gebrauchs-Lsg.	Endkonzentration im Reaktionsansatz	Menge (μl / Reaktionsansatz)
A. bidest., steril	-	ad 24 μl	16,125
Bovines Serum Albumin, azetyliert (B-8894, Sigma)	$\rho = 20 \text{ mg/ml}$	$\rho = 2,0 \times 10^{-3} \text{ g/l}$	2,5
10-fach PCR-Puffer, Magnesium-frei (DyNAzyme™ Buffer F-510S, Finn- zymes Oy)	1-fach (10fach Stamm- lösung 1:10 verdünnt mit A. bidest, steril)	1-fach	2,5
MgCl ₂ -Lösung (F-510S, Finnzymes Oy)	50 mM	4,0 mM MgCl ₂	2,0
dNTP-Mix (F-560L, Finnzymes Oy)	je 10 mM	je 0,2 mM	0,5
CF03 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)	0,1 mM	0,25 μM	0,0625
CF04 oder CF02 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)	0,1 mM	0,25 μM	0,0625
DNA-Polymerase (DyNAzyme™, Finnzymes Oy)	2,0 U/ μl	0,5 U	0,25

Tab. 12: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix des pg50/pg3-PCR-Systems

Komponente	Gehalt der Gebrauchs-Lsg.	Endkonzentration im Reaktionsansatz	Menge (μl / Reaktionsansatz)
A. bidest., steril	-	ad 24 μl	20,25
PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂ (DyNAzyme™ Optimized Buffer, Finnzymes Oy)	1-fach (10fach Stamm- lösung 1:10 verdünnt mit A. bidest, steril)	1,5 mM MgCl ₂	2,5
dNTP-Mix (F-560L, Finnzymes Oy)	je 10 mM	je 0,2 mM	0,5
pg50 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)	0,1 mM	0,5 μM	0,125
pg3 (biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen)	0,1 mM	0,5 μM	0,125
DNA-Polymerase (DyNAzyme™, Finnzymes Oy)	2,0 U/ μl	1 U	0,5

4 Ergebnisse

4.1 Studie 1: Vergleich kultureller Verfahren zum Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch

4.1.1 Nachweisraten von *Campylobacter* in natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch

In der vorliegenden Studie wurden 153 Proben fertigverpackte Geflügelfleischprodukte kulturell gemäß der ISO-Norm 10272:1995 (E) auf *Campylobacter* spp. untersucht. Das Probenkontingent umfasste 61 Proben Geflügelfleisch, 20 Proben Geflügelfleischzubereitungen und 72 Proben Geflügelinnereien, die im Berliner Groß- und Einzelhandel als tiefgefrorene (n = 89) oder frische (n = 64) Ware aufgekauft worden waren.

Unter paralleler Anwendung beider Selektivanreicherungsmedien gemäß ISO 10272:1995 (E) (Preston sowie Park und Sanders-Bouillon) konnten aus 80 (52 %) der 153 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. isoliert werden. Die Gesamtisolierungsrate lag für Frischware bei 43,8 % und für Tiefkühlware bei 58,4 %. Bei Auswertung der Ergebnisse gegliedert nach der Produktart ergaben sich die höchsten Nachweisraten für Geflügelinnereien (65,3 %), gefolgt von Geflügelfleisch (47,5 %) und Geflügelfleischzubereitungen (20 %) (Tab. 13).

Tab. 13: *Campylobacter*-Nachweis (Gesamtisolierungsrate), gegliedert nach Produktart und Angebotszustand

Produktart	Angebotszustand		
	Frisch n (in %)	Tiefgefroren n (in %)	Gesamt n (in %)
Geflügelfleisch	10 (35,7 %)	19 (57,6 %)	29 (47,5 %)
Geflügelfleischzubereitungen	1 (33,3 %)	3 (17,7 %)	4 (20,0 %)
Geflügelinnereien (Leber, Herzen, Mägen)	17 (51,5 %)	30 (76,9 %)	47 (65,3 %)
Σ	28 (43,8 %)	52 (58,4 %)	80 (100 %)

Aus den Ergebnissen der Studie wurden zudem die Prävalenzen von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleischprodukten verschiedener Tierarten berechnet. Die höchste Prävalenz ergab sich für Entenfleisch (62,5 %), allerdings ist hier die geringe Stichprobengröße von nur 8 untersuchten Proben zu berücksichtigen. Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. in Hähnchenfleisch (n = 78) betrug 56,4 %, während in 46,6 % der Putenfleischproben (n = 58) *Campylobacter* spp. nachweisbar waren. *Campylobacter*-Befunde traten auch bei Proben der Tierarten Gans und Wachtel auf (Abb. 7; s. Seite 55).

Hinsichtlich der Speziesverteilung dominierte bei den 80 positiven Proben *Campylobacter jejuni* mit 92,5 % gegenüber *Campylobacter coli* mit 7,5 %. Bezogen auf die Tierarten wurden Unterschiede in der Speziesverteilung festgestellt. So wurden bei Proben vom Huhn nur 2,2 % der Isolate als *Campylobacter coli* identifiziert, während bei Putenprodukten der Anteil der *Campylobacter coli*-Isolate bei 14,8 % lag (Abb. 8; s. Seite 55).

4.1.2 Ergebnisse des Methodenvergleichs

Neben der Ermittlung der Prävalenzen wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss verschiedener kultureller Anreicherungsverfahren gemäß ISO-Norm 10272:1995 (E) auf die Isolierungsrate von *Campylobacter* spp. bei 153 natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten bestimmt.

Mit dem Verfahren nach ISO 10272:1995 (E) konnten unter Verwendung von Preston-Bouillon aus 77 (50 %), mit dem Selektivmedium nach Park und Sanders aus 76 (50 %) von insgesamt 153 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. isoliert werden (Abb. 9; s. Seite 56). Im Einzelnen wurden bei tiefgefrorenen Geflügelprodukten mit beiden Selektivanreicherungen Nachweisraten von jeweils 55 % ermittelt. Mit Preston-Medium konnte bei 43,8 % und mit dem Selektivmedium nach Park und Sanders bei 42,2 % der Frischware ein positiver Nachweis geführt werden (Abb. 10; s. Seite 56). Die Länge der Bebrütungs-dauer (22 ± 2) h oder (46 ± 2) h nahm bei den zwei Selektivanreicherungsmedien keinen Einfluss auf die Nachweisraten.

Ferner wurde die Notwendigkeit einer Blut-Supplementation bei der Preston-Bouillon überprüft. Bei Verwendung von Preston-Medium ohne Blutzusatz konnten in 74 (48 %) Proben thermotolerante *Campylobacter* nachgewiesen werden, während der Einsatz von Preston-Bouillon mit Blutzusatz 77 (50 %) positive Befunde erbrachte (Abb. 9, s. Seite 56). Um eine Aussage über die Vergleichbarkeit dieser beiden Verfahren treffen zu können, wurden die Ergebnisse des Methodenvergleichs mit Hilfe des Vierfeldertests dargestellt (Tab. 14; s. Seite 54). Davon ausgehend wurden für das zu prüfende Alternativverfahren (Preston-Bouillon ohne Blutzusatz) folgende Leistungskriterien ermittelt: relative Genauigkeit, relative Falsch-Positiv-Rate, relative Falsch-Negativ-Rate, relative Spezifität, relative Sensitivität, statistische Übereinstimmung mittels des Konkordanzindex Kappa (Tab. 15; s. Seite 54) (HÜBNER et al., 2002; SACHS, 2002).

Bei Verwendung der Preston-Bouillon ohne Blutzusatz traten 3 falsch-negative, aber keine falsch-positiven Ergebnisse auf. Daraus resultiert eine relative Falsch-Negativ-Rate $[b/(a+b) \times 100]$ von 3,9 % und eine relative Falsch-Positiv-Rate $[c/(c+d) \times 100]$ von 0 %. Die relative Sensitivität $[a/(a+b) \times 100]$ beträgt 96,1 %, die relative Spezifität $[d/(c+d) \times 100]$ liegt bei 100 %. Die Wahrscheinlichkeit, dass mit beiden Methoden des Methodenvergleichs gleiche Resultate erzielt werden (relative Genauigkeit $[(a+d)/n \times 100]$) beträgt 98,0 %. Als Testverfahren zur Ermittlung der statistischen Übereinstimmung der beiden

Verfahren wurde aufgrund der geringen Summe der abweichenden Resultate der Konkordanzindex Kappa $[2(ad-bc)/[(a+c)(c+d)+(a+b)(b+d)]]$ ausgewählt. Die Berechnung ergibt für Kappa den Wert 0,96. Dies bedeutet eine fast vollständige Übereinstimmung beider Methoden.

Tab. 14: Auswerteschema für den Vierfeldertest (SACHS, 2002)

		<i>Alternativmethode</i>		Σ
		+	-	
<i>Referenz- methode</i>	+	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	-	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
Σ		<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>a + b + c + d = n</i>

+: positiver Nachweis

-: negativer Nachweis

a: Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analyseergebnisse

b: Anzahl der falsch negativen Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode

c: Anzahl der falsch positiven Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode

d: Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analyseergebnisse

n: Gesamtanzahl der Analyseergebnisse

Tab. 15: Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon mit bzw. ohne Blut

		<i>Alternativverfahren (Preston-Bouillon ohne Blut)</i>		Σ
		+	-	
<i>Referenzmethode (Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E))</i>	+	74	3	77
	-	0	76	76
Σ		74	79	153

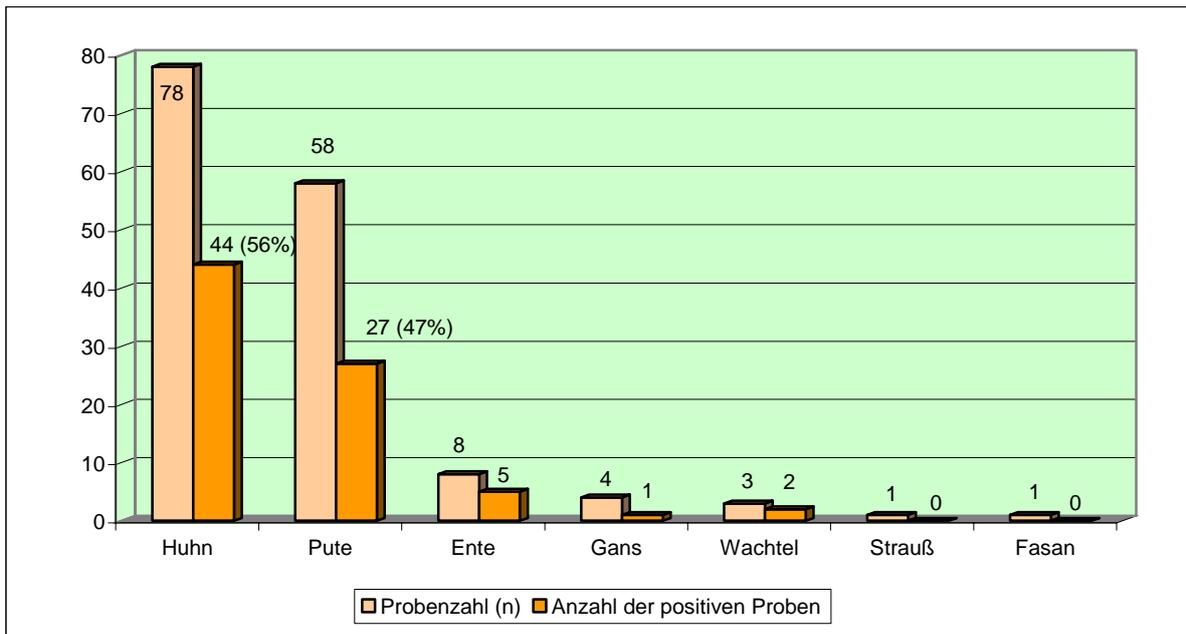


Abb. 7: *Campylobacter*-Nachweisraten, gegliedert nach Tierart

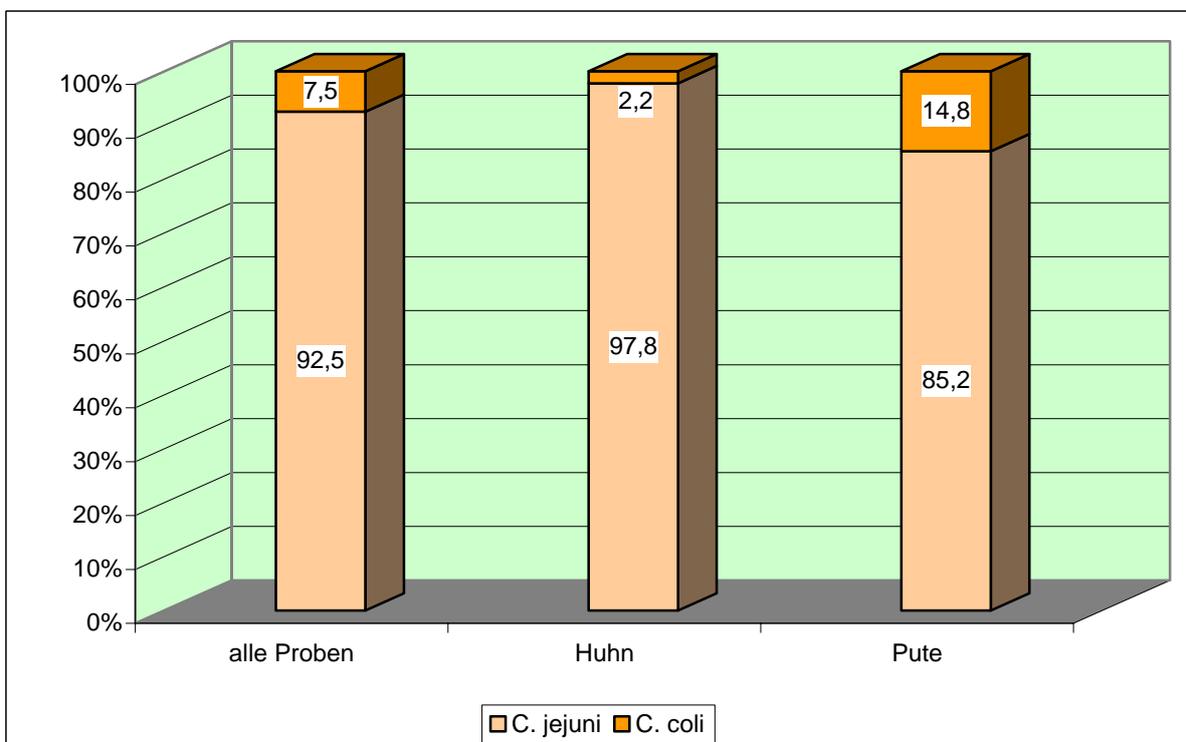


Abb. 8: Speziesprävalenz bei Geflügelfleisch sowie bei Produkten der Tierarten Huhn und Pute

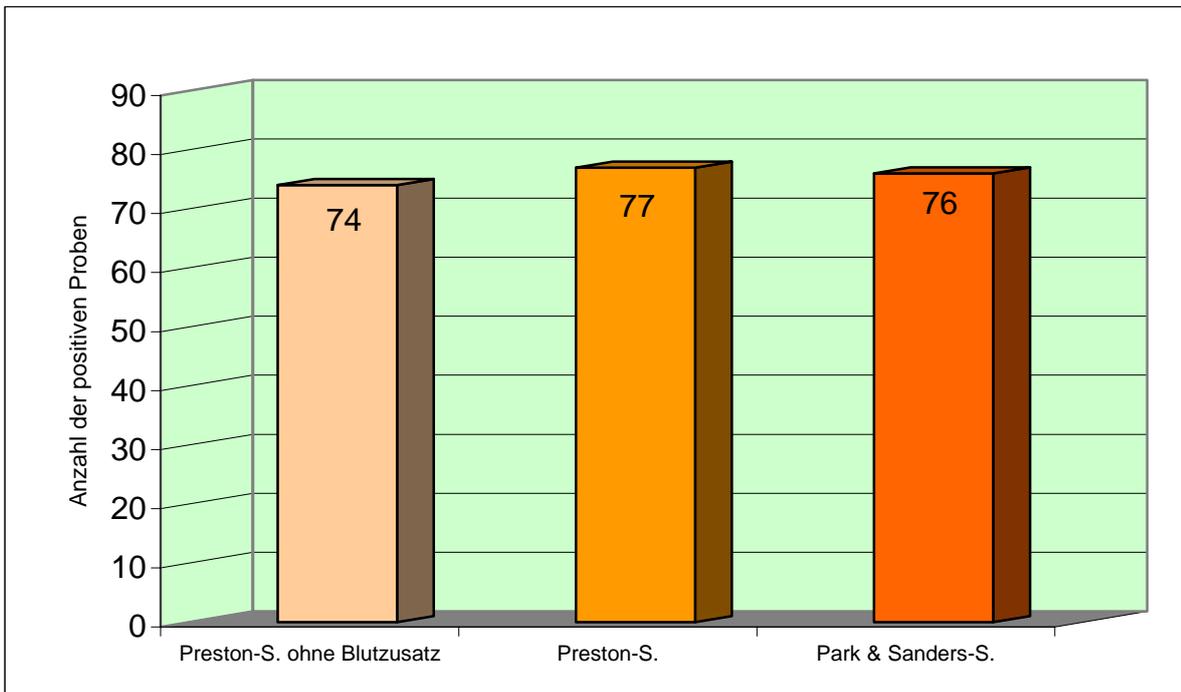


Abb. 9: *Campylobacter*-Nachweise in Abhängigkeit vom verwendeten Selektivanreicherungsmedium

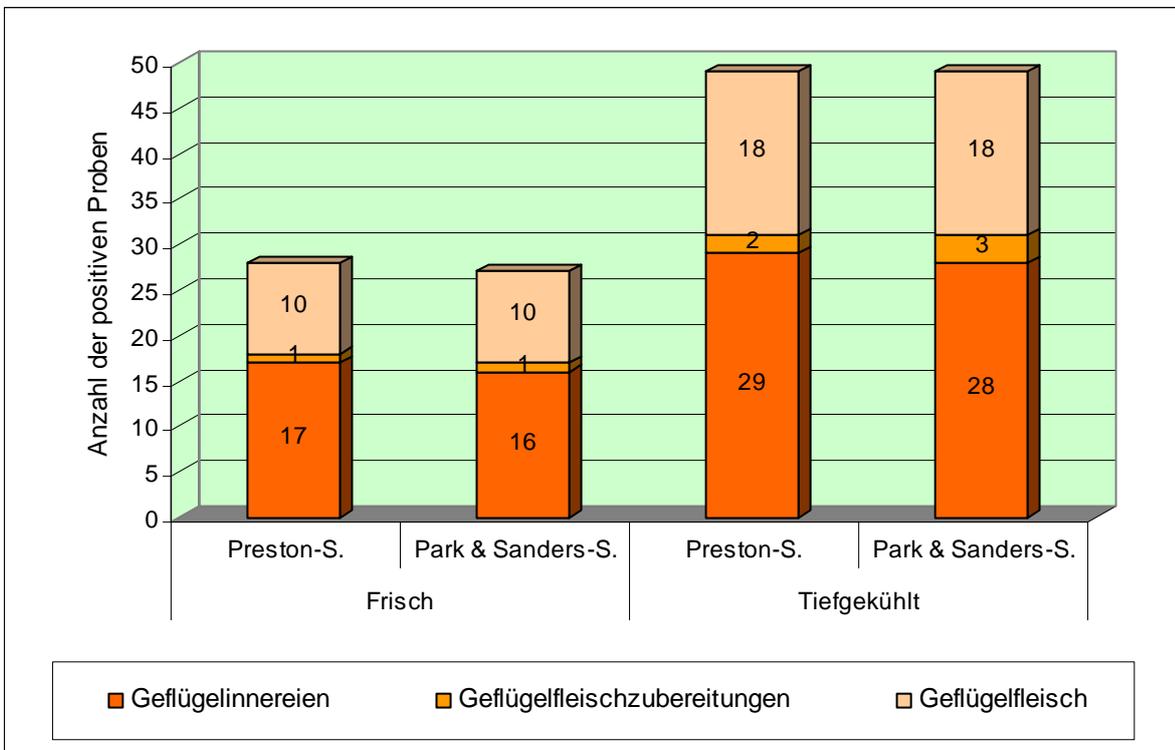


Abb. 10: *Campylobacter*-Nachweise in Abhängigkeit von verwendetem Selektivanreicherungsmedium, Angebotszustand und der Produktart

4.1.3 Ergebnisse der quantitativen und semiquantitativen Untersuchungen

Im Rahmen der quantitativen Untersuchungen konnten bei 18 (22,5 %) der 80 qualitativ positiven Proben *Campylobacter* spp. (jeweils *C. jejuni*) auch quantitativ oberhalb der Nachweisgrenze von $1,0 \times 10^1$ KbE/ml Spülflüssigkeit nachgewiesen werden. Bezogen auf die Probenoberfläche bewegten sich die Keimzahlen zwischen log 3,3 und log 4,1 KbE. Bei der Produktgruppe der Geflügelinnereien traten quantitative *Campylobacter*-Befunde häufiger auf (31,9 %) als bei Geflügelfleisch (9,1 %). So wiesen nur drei Proben Geflügelfleisch (Hühnerklein, Wachteln, Putenoberschenkel) quantitative Befunde auf, während *Campylobacter* bei Hähnchenlebern am häufigsten quantitativ nachgewiesen werden konnte (66,7 % aller positiven Proben) (Tab. 16; s. Seite 58). Der Angebotszustand der Proben (frisch / tiefgefroren) nahm keinen Einfluss auf die Häufigkeit quantitativer Befunde (25,0 % / 21,2 %).

Die Ergebnisse der halbquantitativen Bestimmung der *Campylobacter*-Keimzahlen mittels Titerverfahrens nach Anreicherung in Park und Sanders-Bouillon sind in Tab. 17 (s. Seite 58) dargestellt. Bei Auswertung der Resultate hinsichtlich der Produktart zeigt sich, dass der Anteil von Geflügelinnereien mit Befunden von > 1 KbE/ml Spülflüssigkeit mit 70,4 % mehr als doppelt so hoch ausfällt wie bei Geflügelfleisch (34,4 %) (Abb. 11).

4.1.4 Mikrobiologischer Status der Geflügelfleischprodukte

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Statusbestimmung der 153 Geflügelfleischprodukte sind in Tab. 18 und Tab. 19 aufgeführt (s. Seite 59).

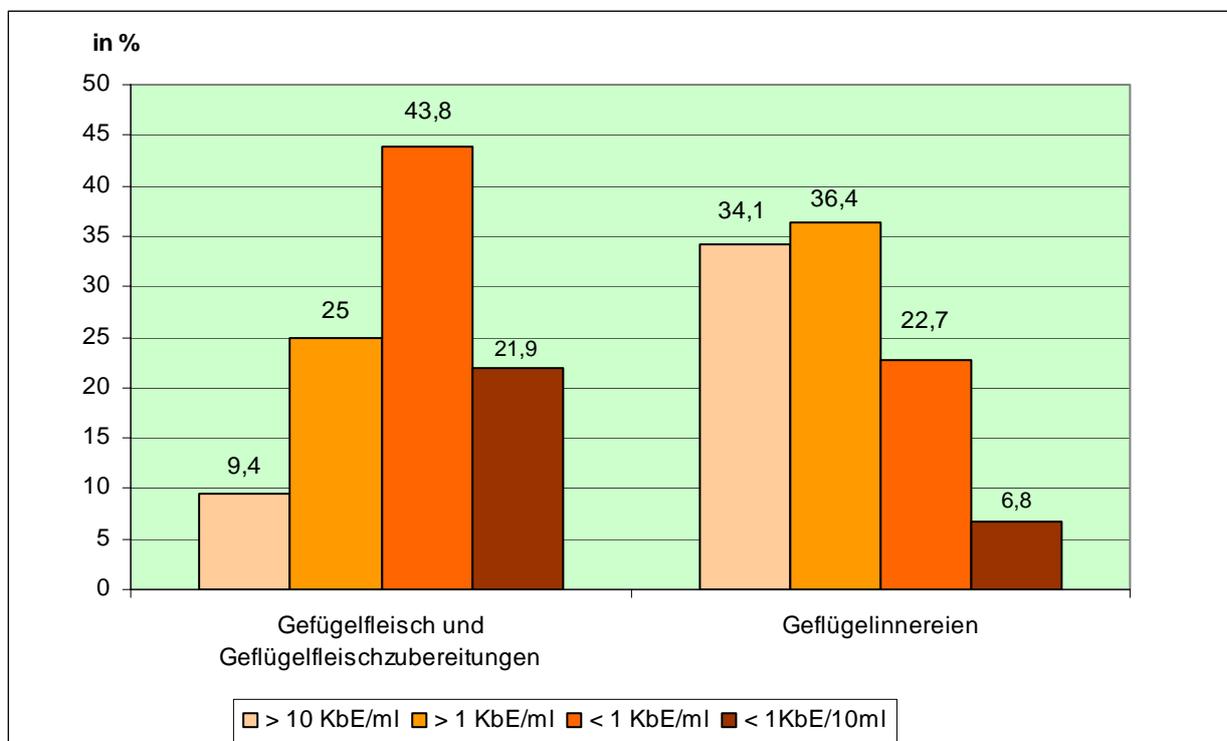


Abb. 11: Ergebnisse der semiquantitativen *Campylobacter*-Bestimmung, gegliedert nach Produktgruppen

Tab. 16: Ergebnisse der quantitativen *Campylobacter*-Bestimmung der Geflügelfleischprodukte

Produktart	Anzahl der quantitativ positiven Proben (Anzahl der qualitativ positiven Proben)	Anteil der quantitativ positiven Proben [in %]
Hähnchenleber	6 (9)	66,7
Hähnchenmägen	2 (13)	15,4
Hähnchenherzen	3 (10)	30,0
Putenleber	4 (11)	36,4
Putenmägen	0 (2)	
Putenherzen	0 (2)	
Σ Geflügelinnereien	15 (47)	31,9
Σ Geflügelfleisch	3 (33)	9,1

Tab. 17: Ergebnisse der halbquantitativen *Campylobacter*-Bestimmung der Geflügelfleischprodukte nach Anreicherung in Park und Sanders-Anreicherungsbouillon (n = 153, davon 76 *Campylobacter*-positiv in 25 ml)

<i>Campylobacter</i> -Nachweis im Ansatz mit ... Spülflüssigkeit			Häufigkeitsklasse	Anzahl der positiven Proben
10 ml	1 ml	0,1 ml		
-	-	-	< 1 KbE / 10 ml	10 (13,1 %)
+	-	-	< 1 KbE / ml	24 (31,6 %)
+	+	-	1 – 9 KbE / ml	24 (31,6 %)
+	+	+	≥ 10 KbE / ml	18 (23,7 %)

Je nach Produktart und Angebotszustand wiesen die Proben mittlere Gesamtkeimzahlen im Bereich von $x_{50} = \log 4,76$ KbE/ml Spülflüssigkeit (Geflügelfleisch, tiefgefroren) bis $x_{50} = \log 6,44$ KbE/ml Spülflüssigkeit (Geflügelfleisch, frisch) sowie von $x_{50} = \log 5,25$ KbE/ml Spülflüssigkeit (Geflügelinnereien, tiefgefroren) bis $x_{50} = \log 5,53$ KbE/ml Spülflüssigkeit (Geflügelinnereien, frisch) auf. Bei der Gruppe der tiefgefrorenen Geflügelfleischzubereitungen lag der Median der Gesamtkeimzahl bei $\log 5,04$ KbE/ml Spülflüssigkeit. Die Gesamtflora wurde bei allen Produktgruppen durch die Zahl der Pseudomonaden bestimmt, gefolgt von den Enterobakteriaceen und Enterokokken.

Ein Zusammenhang zwischen der mikrobiologischen Beschaffenheit der Geflügelfleischprodukte und dem Nachweis von *Campylobacter* ließ sich nicht feststellen. So wurden bei *Campylobacter*-positiven und -negativen Proben vergleichbare mittlere Gesamtkeimzahlen von $x_{50} = \log 5,32$ KbE/ml Spülflüssigkeit bzw. $x_{50} = \log 5,40$ KbE/ml Spülflüssigkeit ermittelt.

Tab. 18: Koloniezahlen (log KbE/ml Spülflüssigkeit) von **frischen** Geflügelfleischprodukten:
 Geflügelfleisch (n = 28), Geflügelfleischzubereitungen (n = 3) und Geflügelinnereien (n = 33)
 unter Angabe von Median (x_{50}), Minimum (x_{\min}), Maximum (x_{\max}), 25 %-Quartil (x_{25}) und
 75 %-Quartil (x_{75})

	mesophile aerobe Gesamtkeimzahl			Pseudomonaden			Enterobakteriaceen			Enterokokken		
	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien
x_{\min} .	3,71	4,99	3,38	2,60	3,65	2,60	2,60	2,78	<2	<2	<2	<2
x_{25}	5,29	5,81	5,04	4,20	5,67	4,20	3,48	4,23	2,78	<2	2,18	<2
x_{50}	6,44	6,08	5,53	5,40	5,97	4,90	4,43	4,52	3,38	2,18	2,30	<2
x_{75}	6,89	7,59	6,26	6,61	7,59	5,94	5,09	5,53	4,20	3,47	3,28	2,30
x_{\max} .	8,36	7,88	7,86	8,28	7,88	7,89	7,64	5,81	6,20	5,78	3,59	3,79

Tab. 19: Koloniezahlen (log KbE/ml Spülflüssigkeit) von **tiefgekühlten** Geflügelfleischprodukten:
 Geflügelfleisch (n = 33), Geflügelfleischzubereitungen (n = 17) und Geflügelinnereien (n = 39)
 unter Angabe von Median (x_{50}), Minimum (x_{\min}), Maximum (x_{\max}), 25 %-Quartil (x_{25}) und
 75 %-Quartil (x_{75})

	mesophile aerobe Gesamtkeimzahl			Pseudomonaden			Enterobakteriaceen			Enterokokken		
	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien	Geflügel fleisch	Geflügelfleisch zubereitungen	Innereien
x_{\min} .	2,30	3,34	3,30	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
x_{25}	4,30	4,78	4,86	2,78	3,40	3,45	<2	<2	2,30	<2	<2	<2
x_{50}	4,76	5,04	5,26	3,58	3,90	4,00	2,60	2,60	3,04	<2	<2	2,30
x_{75}	4,99	5,46	5,80	4,58	4,83	4,62	3,04	3,08	3,73	2,60	2,60	3,22
x_{\max} .	7,88	6,11	6,64	7,41	5,18	6,04	4,86	4,30	5,76	3,78	4,64	5,30

4.2 Studie 2: Vergleich zweier PCR-Systeme für das Screening auf thermotolerante *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch

4.2.1 Ergebnis des Methodenvergleichs

In der zweiten Studie wurden 80 frische und tiefgefrorene Geflügelfleischprodukte kulturell mit dem Referenzverfahren nach ISO-Norm 10272:1995 (E) unter Verwendung der Selektivanreicherungsbouillon nach Preston auf *Campylobacter* spp. untersucht. Im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung wurden parallel zwei PCR-Systeme (WEGMÜLLER et al., 1993 und OYOFO et al., 1992) eingesetzt und hinsichtlich ihrer Eignung als alternative Screeningverfahren überprüft.

Mit dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 10272:1995 (E) konnten in 44 (55%) von 80 untersuchten Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden. Der Nachweis spezifischer Gensequenzen mit dem seminested PCR-System nach WEGMÜLLER et al. (1993) ergab ebenfalls 44 positive Ergebnisse, dies entspricht einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % (Tab. 20).

Mit dem pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992) wurden 43 positive, ein falsch-negatives und 5 falsch-positive Ergebnisse ermittelt. Um eine Aussage über die Vergleichbarkeit des pg50/pg3-PCR-Systems nach OYOFO et al. (1992) zu erzielen, wurden für das Alternativverfahren folgende Leistungskriterien mittels Vierfeldertest (siehe Abschnitt 4.1.2) ermittelt: relative Genauigkeit, relative Falsch-Positiv-Rate, relative Falsch-Negativ-Rate, relative Spezifität, relative Sensitivität, statistische Übereinstimmung mittels des Konkordanzindex Kappa (Tab. 21).

Tab. 20: Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E) mit der seminested PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993)

		<i>Alternativverfahren (seminested PCR)</i>		Σ
		+	-	
<i>Referenzmethode (Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E))</i>	+	44	0	44
	-	0	36	36
Σ		44	36	80

Tab. 21: Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E) mit dem pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992)

		<i>Alternativverfahren (pg50/pg3-PCR-System)</i>		Σ
		+	-	
<i>Referenzmethode (Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E))</i>	+	43	1	44
	-	5	31	36
Σ		48	32	80

Bei Verwendung des pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992) traten 5 falsch-positive Ergebnisse und ein falsch-negatives Resultat auf. Daraus resultiert eine relative Falsch-Negativ-Rate $[b/(a+b) \times 100]$ von 2,3 % und eine relative Falsch-Positiv-Rate $[c/(c+d) \times 100]$ von 13,9 %. Die relative Sensitivität $[a/(a+b) \times 100]$ beträgt 97,7 %, die relative Spezifität $[d/(c+d) \times 100]$ liegt bei 86,1 %. Die Wahrscheinlichkeit, dass mit beiden Nachweisverfahren des Methodenvergleichs gleiche Resultate erzielt werden (relative Genauigkeit $[(a+d)/n \times 100]$) beträgt 92,5 %. Als Testverfahren zur Ermittlung der statistischen Übereinstimmung der beiden Verfahren wurde aufgrund der geringen Summe der abweichenden Resultate der Konkordanzindex Kappa $[2(ad-bc)/[(a+c)(c+d)+(a+b)(b+d)]$ ausgewählt. Die Berechnung ergibt für Kappa den Wert 0,85. Dies bedeutet eine fast vollständige Übereinstimmung der beiden Verfahren.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung / Fragestellung

Thermotolerante *Campylobacter* sind in Deutschland neben Salmonellen die häufigste Ursache für bakterielle Enteritiden beim Menschen. Der Erreger wird hauptsächlich durch tierische Lebensmittel, insbesondere Geflügelprodukte übertragen. So konnten in mehreren Fall-Kontrollstudien der Verzehr von Geflügelfleisch und der Umgang mit Geflügelfleisch bei der Speisenzubereitung als Risikofaktoren für die humane *Campylobacter*-Infektion identifiziert werden (NEIMANN et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2004; WINGSTRAND et al., 2006). Die kulturelle Isolierung von *Campylobacter* aus Lebensmitteln gestaltet sich allerdings schwierig, da die Keime hohe Wachstumsansprüche besitzen und oft nur einen geringen Anteil der Gesamtfloora im Lebensmittel ausmachen. Zudem können *Campylobacter* in Lebensmitteln aufgrund äußerer Einflüsse oder technologischer Prozesse, wie Tiefgefrieren, Zerkleinerungsschritte oder Verwendung von Zusatzstoffen und Würzmitteln, subletal geschädigt sein (PARK, 2002). Aufgrund der niedrigen Infektionsdosis von wenigen hundert Keimen ist es jedoch erforderlich, bereits geringe *Campylobacter*-Gehalte in Lebensmitteln mit entsprechend sensitiven und standardisierten Verfahren nachzuweisen. Eine erste Normierung eines kulturellen Nachweisverfahrens erfolgte auf internationaler Ebene mit der Veröffentlichung der ISO 10272:1995 (E). Diese Vorschrift bietet die Option zwischen zwei Anreicherungsverfahren, die sich hinsichtlich der Nährmedienzusammensetzung und der Inkubationsbedingungen unterscheiden. Ein wesentlicher Nachteil des kulturellen Verfahrens besteht in dem nicht unerheblichen Zeitbedarf. Daher werden auch in der Routinediagnostik zunehmend molekularbiologische Verfahren, wie die Polymerase-Kettenreaktion, als Schnellmethoden eingeführt. Für den Einsatz als Screeningtechnik muss das PCR-Verfahren allerdings mindestens die Sensitivität der kulturellen Nachweismethode erreichen.

In der vorliegenden Studie sollten durch die Untersuchung von natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten mit den in der ISO 10272:1995 (E) beschriebenen **kulturellen Anreicherungsverfahren** folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Werden mit dem Anreicherungsprotokoll nach Preston bzw. Park und Sanders unterschiedliche Isolierungsraten bei natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten, auch unter Berücksichtigung von Produktart und Angebotszustand, erzielt?
- Besitzt die Dauer der Inkubation der Anreicherungsmedien (24 h oder 48 h) einen Einfluss auf die Nachweisraten?
- Besteht die Notwendigkeit einer Blutsupplementation des Flüssigmediums nach Preston?
- In welchem Ausmaß sind frische und tiefgefrorene Geflügelfleischprodukte im Berliner Einzelhandel qualitativ und quantitativ mit *Campylobacter* belastet?

Im weiteren Verlauf der Studie wurde die Eignung zweier **PCR-Verfahren** für ein schnelles und sensitives Screening von natürlich mit *Campylobacter* kontaminierten Geflügelfleisch im Vergleich mit der kulturellen Methode nach ISO 10272:1995 (E) unter Verwendung von Preston-Bouillon überprüft.

5.2 Nachweisraten von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch

In der vorliegenden Erhebung konnten mit dem Verfahren nach ISO 10272:1995 (E) bei paralleler Anwendung beider Selektivanreicherungsmedien aus 80 (52 %) der 153 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. isoliert werden. Hinsichtlich der untersuchten Produktgruppen ergaben sich die höchsten Nachweisraten bei Geflügelinnereien (65,3 %), gefolgt von Geflügelfleisch (47,5 %) und Geflügelfleischzubereitungen (20 %).

Vergleichbare Daten liefern andere Studien, in denen Nachweisraten von 57,3 % in Geflügelfleisch (WERTH, 2006), 58,1 % in Hähnchenfleisch (LUBER, 2004), 62,5 % in Geflügelfleischprodukten (SVOBODA et al., 2002) und 67,6 % in Hähnchenschenkeln (LUBER et al., 2005) ermittelt wurden. Andererseits sind in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben über die *Campylobacter*-Prävalenz in Geflügelfleisch zu finden, was möglicherweise auf abweichende Verfahren in der Probenvorbereitung (destruktiv, nicht-destruktiv, Probeneinwaage), die Zusammensetzung der Stichprobe (Art und Herkunft der Proben, jahreszeitliche Einflüsse) oder unterschiedliche Nachweisverfahren zurückzuführen ist. In neueren Untersuchungen aus Deutschland werden für Hähnchenfleisch Prävalenzen von 38,3 % (ALTER et al., 2004) bis 87 % (LUBER und BARTELT, 2007) genannt.

In der vorliegenden Arbeit wies die Produktgruppe der frischen und tiefgefrorenen **Geflügelinnereien** mit 65,3 % die höchste Nachweisrate auf. Dieses Ergebnis stimmt weitgehend mit anderen publizierten Daten überein, die insbesondere in Geflügellebern hohe Prävalenzen feststellten. So zeigte eine Erhebung in der Schweiz, dass 63,2 % der frischen und gefrorenen Geflügellebern mit *Campylobacter* belastet waren (SVOBODA et al., 2002). In einer anderen Studie erwiesen sich 31 % der frischen und 16 % der gefrorenen Lebern als kontaminiert. Weitere Versuche zeigten, dass die *Campylobacter*-Kontamination nicht nur auf die Leberoberfläche begrenzt ist (BAUMGARTNER et al., 1995). Bei der Untersuchung von gefrorenen Hähnchenlebern ermittelten FERNÁNDEZ und PISÓN (1996) noch deutlich höhere Prävalenzraten von 92,9 %. Dagegen konnte WERTH (2006) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Produktarten Geflügelfleisch (54,6 %) und Geflügelinnereien (59,9 %) hinsichtlich der Prävalenzen feststellen.

Nicht unerwartet wurde in der eigenen Erhebung bei Geflügelfleischzubereitungen die geringste Nachweisrate (20 %) ermittelt, was vermutlich auf Verdünnungseffekte und Inaktivierungsprozesse zurückzuführen ist. So umfasste das Probenkontingent unter anderem marinierte Produkte, Geflügelteilstücke, die mit Flüssigwürze behandelt und/oder paniert waren, sowie Bratwürste und Fleischspieße.

Eine vergleichsweise hohe Nachweisrate wurde in der vorliegenden Arbeit für *Campylobacter* in **Tiefkühl-Ware** ermittelt (58,4 %), die sogar die Isolierungsrate in **Frischprodukten** (43,8 %) übersteigt. Dagegen wurden in anderen Studien bei gefrorenen Produkten in der Regel deutlich geringere Prävalenzen festgestellt, die im Bereich von 7,9 % bis 39,5 % lagen (ABU-RUWAIDA et al., 1996; BRECHTEL et al., 2002; LEDERGERBER et al., 2003; WERTH, 2006). Auf der anderen Seite berichteten einige Autoren auch über hohe Kontaminationsraten bei tiefgekühltem Geflügel. JØRGENSEN et al. (2002) ermittelten bei tiefgefrorenen Hähnchen Prävalenzraten zwischen 81 % und 85 %, und auch in der Schweiz erwiesen sich gefrorene Geflügelproben als hochgradig mit *Campylobacter* kontaminiert (SVOBODA et al., 2002). Bezüglich der Frage, ob *Campylobacter* den Gefrierprozess und eine längere Gefrierlagerung überleben können, kommen neuere Studien zu dem Ergebnis, dass sich zu Beginn der Gefrierlagerung zwar eine signifikante Abnahme der Keimzahlen um bis zu zwei \log_{10} -Stufen verzeichnen lässt, die Keimzahlen danach aber konstant bleiben und keine subletale Schädigung eintritt (MOORHEAD und DYKES, 2002; ARCHER, 2004).

Die Auswertung der eigenen Daten hinsichtlich der **Tierart** zeigt, dass in 56,4 % der Hähnchenfleischprodukte *Campylobacter* spp. nachweisbar waren, während in Produkten aus Putenfleisch eine etwas geringere Prävalenz von 46,6 % ermittelt wurde. Vergleichbare Relationen mit jeweils leicht höheren Werten für Hähnchenfleischprodukte wurden von WERTH (2006) mit 58,8 % (Huhn) und 54,1 % (Pute) sowie von WHYTE et al. (2004) mit 49,9 % (Huhn) und 37,5 % (Pute) publiziert. Dagegen wurden in zwei anderen Studien deutlich geringere Kontaminationsraten bei Putenfleisch festgestellt, die bei nur 14,0 % bzw. 6,2 % lagen (ZHAO et al., 2001; ALTER et al., 2004).

Nach den Ergebnissen der **Speziesdifferenzierung** dominiert in der vorliegenden Erhebung *C. jejuni* mit 92,5 % gegenüber *C. coli* mit 7,5 %. Eine ähnliche Artenverteilung wird auch von anderen Autoren berichtet, die 84 % - 98 % der aus Geflügelfleisch isolierten *Campylobacter*-Stämme der Spezies *C. jejuni* zuordnen konnten (JØRGENSEN et al., 2002; SCHERER, 2006; LUBER und BARTELT, 2007). Bei den einzelnen Geflügelarten kommen allerdings Unterschiede in der Speziesverteilung vor. So wurden in der eigenen Studie

bei Proben vom Huhn nur 2,2 % der Isolate als *C. coli* identifiziert, während bei Putenfleischprodukten der Anteil der *C. coli*-Isolate bei 14,8 % lag. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von ALTER et al. (2004), die *C. coli* in 23 % der Putenfleischproben, aber nur in 8 % der Hähnchenfleischproben nachwies.

5.3 Quantitative und semiquantitative Erfassung der *Campylobacter*-Kontamination von Geflügelfleisch

Die **semiquantitative Bestimmung** der *Campylobacter*-Keimzahlen mittels Titerverfahrens nach Anreicherung in Park und Sanders-Bouillon ergab, dass 32 % der qualitativ positiven Proben Keimgehalte von 1 - 9 Kbe/ml Spülflüssigkeit aufwiesen. Keimgehalte von ≥ 10 Kbe/ml Spülflüssigkeit traten bei 24 % der qualitativ positiven Proben auf.

Die **quantitativen Untersuchungen** wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Spatelverfahren aus der Spülflüssigkeit durchgeführt. Dabei wiesen 22,5 % der qualitativ positiven Proben *Campylobacter*-Keimzahlen zwischen $\log 3,3$ und $\log 4,1$ Kbe/ Probenoberfläche auf. Quantitative und halbquantitative Befunde ließen sich überwiegend bei Geflügelinnereien erzielen, wobei Hähnchenlebern besonders häufig mit Keimgehalten von $> \log 3,3$ Kbe/Probenoberfläche kontaminiert waren. Ähnlich hohe Belastungen von frischer und gefrorener Hühnerleber (> 1000 *Campylobacter*/g) wurden auch aus der Schweiz berichtet (BAUMGARTNER et al., 1995). Der Angebotszustand der Proben nahm in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Häufigkeit quantitativer Befunde (25,0 % frische Produkte, 21,2 % tiefgefrorene Produkte), wohingegen JØRGENSEN et al. (2002) quantitative Ergebnisse bei 48 % der frischen Hähnchen, aber nur bei 15 % der gefrorenen Hähnchen erzielen konnten.

Ein Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse mit anderen Literaturdaten fällt schwer, da bis Ende der 1990er Jahre nur wenige halbquantitative Studien durchgeführt wurden (TOKUMARU et al., 1990; FERNÁNDEZ und PISÓN, 1996). Auch die quantitativen Daten aus neueren Erhebungen sind nicht direkt vergleichbar, da sich die Untersuchungen hinsichtlich der Probenart (ganzer Schlachtkörper oder Teilstücke, mit oder ohne Haut), des Angebotszustands, der Probenvorbereitung, des Untersuchungsverfahrens (Spatelverfahren oder MPN) und der Ergebnisangabe (pro ml Spülflüssigkeit, pro g Haut oder Muskulatur, pro cm^2 Oberfläche) unterscheiden.

JOSEFSEN et al. (2002) führten vergleichbare semiquantitative Untersuchungen an Hähnchenkarkassen unter Verwendung von Park und Sanders-Bouillon durch. Dabei wiesen 60 % der Proben Keimgehalte von 1 - 9 Kbe/ml Spülflüssigkeit auf, bei 30 % der Proben lagen die Keimzahlen im Bereich von 10 - 99 Kbe/ml Spülflüssigkeit. Der höhere Anteil von Proben mit quantitativen Befunden ist vermutlich auf das einheitlichere Probenmaterial (ausschließlich Schlachtkörper mit Haut) zurückzuführen. Im Vergleich mit den eigenen Daten wurden in neueren quantitativen Studien an Hähnchenprodukten mit Haut geringfügig höhere Keimgehalte ermittelt, die sich im Bereich von $\log 4,0$ bis $\log 5,0$ Kbe/beprobte Oberfläche bewegten (JØRGENSEN et al., 2002; SCHERER et al., 2006).

5.4 Vergleich kultureller Nachweisverfahren

In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob mit den beiden Alternativverfahren der ISO-Norm 10272:1995 (E), d.h. Preston-Bouillon und Medium nach Park und Sanders, unterschiedliche Isolierungsraten für *Campylobacter* spp. in natürlich kontaminierten Geflügelfleischprodukten erzielt werden. Unter Verwendung von Preston-Bouillon konnten aus 77 Proben und mit dem Selektivmedium nach Park und Sanders aus 76 Proben *Campylobacter* spp. isoliert werden. Obwohl die Verwendung der Park und Sanders-Bouillon

bei Proben empfohlen wird, in denen *Campylobacter* durch technologische Prozesse wie beispielsweise Tiefgefrieren vorgeschädigt sein könnte, wurden in den eigenen Untersuchungen bei tiefgefrorenen Geflügelprodukten mit beiden Selektivanreicherungen identische Nachweisraten ermittelt. Da die Selektivanreicherung nach Park und Sanders mehrstufig supplementiert und inkubiert wird, ist dieses Verfahren mit deutlich höherem Material-, Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden. Es erscheint ratsam, unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Probenmatrix jeweils zu prüfen, ob dieser Mehraufwand gerechtfertigt ist. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint dies bei frischem und gefrorenem Geflügelfleisch, Geflügelinnereien und Geflügelfleischzubereitungen nicht der Fall zu sein.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen weisen andere Vergleichsstudien darauf hin, dass durch das Park und Sanders-Anreicherungsverfahren mit stufenweiser Erhöhung der Inkubationstemperatur und verzögerter Zugabe der Antibiotika höhere Wiederfindungsraten erzielt werden. So ermittelten FEDERIGHI et al. (1999) bei der Untersuchung von Geflügelrohwürsten mit der Park und Sanders-Anreicherung eine um 33 % höhere Nachweisrate als mit der Selektivanreicherung nach Preston. In Austern und zerkleinertem Gemüse konnten nur mit der Park und Sanders-Anreicherung *Campylobacter* spp. isoliert werden. Die Überlegenheit der Park und Sanders-Anreicherung beruht vermutlich darauf, dass *Campylobacter* in den Rohwürsten durch Prozessfaktoren (intensive Zerkleinerung, Sauerstoffeintrag, konkurrierende Reifungsflora) wesentlich stärker gestresst waren und die 18-stündige Inkubation im Preston-Medium für die Wiederbelebung und Vermehrung nicht ausreichte. SCOTTER et al. (1993) stellten bei Hühnerhautproben, die mit geringen *Campylobacter*-Zahlen kontaminiert waren, bei Verwendung der Park und Sanders-Anreicherung (82 %) eine signifikant höhere Nachweisrate fest als mit der Selektivanreicherung nach Preston (54 %). Auch bei Untersuchungen von gekühlten und gefrorenen Hähnchenfleischproben erwies sich die Anreicherung mit dem Park und Sanders-Medium der Preston-Bouillon als überlegen (DE BOER und HUMPHREY, 1991; TANGVATCHARIN et al., 2005).

Dagegen sahen JOSEFSEN et al. (2002) Vorteile bei der Verwendung des Preston-Verfahrens. Die Untersuchung von natürlich kontaminierten Hähnchenkarkassen ergab mit beiden Verfahren gemäß ISO 10272:1995 (E) übereinstimmende Nachweisraten. Bei der semiquantitativen Bestimmung mittels Titerverfahren wiesen sogar 13 von 20 Spülproben mit dem Preston-Verfahren höhere Keimgehalte auf, was die Autoren auf eine bessere Sensitivität des Preston-Protokolls zurückführten. Diese Vermutung konnte durch einen Inokulationsversuch mit *C. jejuni* bestätigt werden, bei dem für das Preston-Verfahren eine Sensitivität von 1 KbE/10 ml Bouillon gegenüber 100 KbE/10 ml Bouillon für die Park und Sanders-Methode ermittelt wurde. Nach Ansicht der Autoren bietet das Preston-Verfahren gegenüber dem Park und Sanders-Protokoll noch weitere Vorteile, wie den geringeren Arbeitsaufwand, die einheitliche Inkubationstemperatur von 42°C und die kommerzielle Verfügbarkeit des Mediums. Bedeutsam ist auch das niedrigere Kontaminationsrisiko, da ein wiederholtes Öffnen der Probengefäße für die Antibiotika-Supplementierung entfällt.

In der ISO 10272:1995 (E) sind für die Selektivanreicherungsmedien nach Preston und Park und Sanders unterschiedliche Inkubationszeiten vorgesehen. Während das Flüssigmedium nach Preston nur 18 Stunden bebrütet wird, erfolgt die Inkubation der Park und Sanders-Bouillon für 46 bis 48 Stunden. In der vorliegenden Studie nahm die **Länge der Bebrütungsdauer** (24 h und 48 h) bei beiden Selektivanreicherungsmedien keinen Einfluss auf die Nachweisraten. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von UYTENDAELE und DEBEVERE (1996), die bei einer 48-stündigen Bebrütung der Preston-Bouillon keine statistisch signifikanten Vorteile feststellten. Dagegen konnte WERTH (2006) nach 48-stündiger Bebrütung der Preston-Bouillon signifikant höhere Nachweisraten erzielen. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht direkt vergleichbar, da die Versuche mit artifiziell beimpfter Bouillon durchgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Notwendigkeit einer **Blut-Supplementation** bei der Preston-Bouillon überprüft. Ein solcher Zusatz erhöht einerseits die Kosten und zum anderen begrenzt er die Haltbarkeit des fertigen Mediums. Bei Verwendung von Preston-Medium ohne Blutzusatz traten drei falsch-negative Ergebnisse auf, so dass im Vergleich mit dem Preston-Protokoll gemäß ISO 10272:1995 (E) eine

relative Sensitivität von 96,1 % resultierte. Die statistische Auswertung mittels des Konkordanzindex Kappa ergab eine fast vollständige Übereinstimmung der beiden Verfahren. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint bei der Verwendung von frisch hergestellter Preston-Bouillon (maximal 3 Tage alt) eine Blutsupplementation nicht unbedingt erforderlich zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch UYTENDAELE und DEBEVERE (1996), die bei der Untersuchung von frischem Geflügelfleisch mit Preston-Medium ohne Blutzusatz keine signifikant niedrigeren Nachweisraten ermittelten.

5.5 Vergleich zweier PCR-Verfahren

Da der Wunsch nach schnellen Screeningmethoden sowohl in der amtlichen Routinediagnostik als auch in der Lebensmittelwirtschaft stetig zunimmt, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Studie eine Vergleichsuntersuchung mit zwei molekularbiologischen Nachweisverfahren (OYOFO et al., 1992; WEGMÜLLER et al., 1993) und dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 10272:1995 (E) unter Verwendung von Preston-Bouillon durchgeführt. Ein Screeningverfahren ist nur dann effizient in der lebensmittelhygienischen Routinediagnostik einsetzbar, wenn keine falsch-negativen Ergebnisse auftreten und der Anteil an falsch-positiven Resultaten möglichst gering ausfällt. Bei der Untersuchung von 80 frischen und tiefgefrorenen Geflügelfleischprodukten konnten sowohl mit dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 10272:1995 (E) als auch mit dem seminested PCR-System nach WEGMÜLLER et al. (1993) in 44 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. bzw. spezifische Gensequenzen nachgewiesen werden. Mit dem pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992) wurden 43 positive, ein falsch-negatives und 5 falsch-positive Ergebnisse ermittelt, so dass sich eine relative Sensitivität von 97,7 % und eine relative Spezifität von 86,1 % ergab.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass mit der **seminested PCR** nach WEGMÜLLER et al. (1993) eine deutliche Verkürzung der Untersuchungszeit möglich ist, wobei Sensitivität und Spezifität des Verfahrens denen der kulturellen Referenzmethode entsprechen. Erste Ergebnisse liegen im Allgemeinen am Ende des zweiten Untersuchungstages vor. Je nach Fragestellung können im Bedarfsfall alle PCR-positiven Proben kulturell weiterbearbeitet werden. Das Verfahren eignet sich auch für die schnelle Bestätigung präsumtiv verdächtiger Kolonien. Es bietet allerdings nicht die Möglichkeit zur Automatisierung und gestattet auch keine Speziesdifferenzierung zwischen *C. jejuni* und *C. coli*.

Die hohe Sensitivität der seminested PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993) wurde auch von anderen Autoren bestätigt. Sie ist vor allem auf die niedrige Nachweisgrenze des Systems zurückzuführen, die in Inokulationsversuchen mit < 3 KbE/g Fleisch (nach 18-stündiger Inkubation in Rosef-Bouillon) und mit 1,4 KbE/ml inokulierter Milch (nach 24-stündiger Anreicherung in Preston-Bouillon) angegeben wurde (WAAGE et al., 1999; MÄDE und STARK, 2000). Die hohe Spezifität des PCR-Systems erklärt sich durch das seminested-Prinzip, da hierbei unspezifische PCR-Produkte aus der ersten Reaktion durch das zweite Primerpaar nicht amplifiziert werden (WINTERS et al., 1997).

Gemäß der vorliegenden Studie eignet sich das **pg50/pg3-System** nach OYOFO et al. (1992) ohne Verifizierung der Spezifität des Amplifikats nicht als Screeningverfahren für den Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch. Die ermittelte hohe relative Falsch-Positiv-Rate von 13,9 % ist allerdings unter Vorbehalt zu sehen, da die mit dem pg50/pg3-PCR-System erzielten falsch-positiven Befunde nicht durch eine Hybridisierung verifiziert wurden. Nach der DIN 10134:1998 bzw. der Folgenorm DIN EN ISO 20838:2006 sollte die Identität des nachgewiesenen PCR-Produkts durch ein geeignetes Verfahren bestätigt werden. Dies kann durch DNA-Sequenzierung, Restriktionsanalyse oder durch Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden (z. B. southernblot- oder slotblot-Technik) erfolgen. Für die pg50/pg3-PCR wurden verschiedene DNA-Sonden beschrieben (OYOFO et al., 1992; CHUMA et al., 1997; MÄDE und STARK, 2000). In der vorläufigen amtlichen Methode nach § 64 LFGB (BVL L 00.00-96 (V)) für den molekularbiologischen Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* in Lebensmitteln wird als Verifizierungsverfahren beispielhaft

die Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde dargestellt (BVL, 2006). Die Möglichkeit der Southernblot-Hybridisierung muss allerdings im Routinelabor apparativ und personell etabliert sein.

Mit dem pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992) trat bei den durchgeführten Untersuchungen zudem ein falsch-negatives Ergebnis auf, das vermutlich auf eine zu geringe Sensitivität des pg50/pg3-Systems zurückzuführen ist. Für den Einsatz als schnelle Screeningmethode muss die PCR jedoch mindestens die Sensitivität der kulturellen Nachweismethode erreichen. Im vorliegenden Fall führte die CF03/CF04-PCR zu einem, allerdings sehr schwachen Amplifikat. Die durchgeführte externe Amplifikationskontrolle zeigte, dass keine Inhibition vorlag. Es ist davon auszugehen, dass eine Hybridisierung der Amplifikate die Sensitivität und die Spezifität der pg50/pg3-PCR deutlich erhöht.

Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen von MÄDE und STARK (2000) gestützt, die das pg50/pg3-System einschließlich der Verifizierung mittels Southernblot-Hybridisierung überprüften und dabei im Vergleich mit dem kulturellen Verfahren nach ISO 10272:1995 (E) eine Sensitivität von 100 % ermittelten. Die Nachweisgrenze entsprach jener der kulturellen Methode und betrug 1,4 KbE/ml inokulierter Milch. Nach einer Studie von BRECHTEL et al. (2002) ist das PCR-System nach OYOFO et al. (1992) auch für den Nachweis von *Campylobacter* spp. in tiefgekühlten Geflügelfleischproben gut geeignet, da die Resultate der PCR und der kulturellen Methode nach ISO 10272:1995 (E) zu 100 % übereinstimmten. Die Sensitivität der pg50/pg3-PCR lässt sich zudem durch die Dauer der Anreicherung und die Art des Anreicherungsmediums beeinflussen. Durch eine sechsstündige Anreicherung konnten MANZANO et al. (1995) die Sensitivität der PCR von 75 % (ohne Anreicherung) auf 94 % erhöhen. Die Nachweisgrenze lag ohne Anreicherung bei nur $10^2 - 10^3$ KbE/g Geflügelfleisch.

Ein weiterer kritischer Punkt, der die Sensitivität eines PCR-Screeningverfahrens wesentlich beeinflusst, ist die **DNA-Extraktion**. Sie muss schnell, sicher und einfach durchzuführen, trotzdem aber effizient genug sein, um falsch-negative PCR-Ergebnisse auszuschließen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete kommerzielle DNA-Extraktionskit (DNeasy™ Tissue Kit der Fa. Qiagen) erfüllte - unter Berücksichtigung der externen Amplifikationskontrollen - diese Voraussetzungen. Dagegen berichteten MÄDE und STARK (2000) über eine unzureichende Extraktions- und Reinigungseffizienz bei Verwendung des Wizard® Genomic DNA Extraktion Kit (Fa. Promega) bei Fleisch und Innereien, was auf eine ungenügende Abtrennung von PCR-Inhibitoren zurückgeführt wurde. Deutlich bessere Ergebnisse konnten STRAUB et al. (1999) mit dem QIAamp™ Blood and Tissue Kit (Fa. Qiagen) erzielen, der wie der in den eigenen Untersuchungen eingesetzte DNeasy™ Tissue Kit auf der Bindung der Nukleinsäuren an eine Silicamatrix beruht. Um die Effizienz des eingesetzten Nukleinsäure-Extraktionsverfahrens zu überprüfen, sollte im Labor in festgelegten Abständen eine positive Prozesskontrolle durchgeführt werden, bei der eine mit dem Zielkeim beimpfte Probe das gesamte Verfahren von der Probenvorbereitung über Anreicherung, DNA-Extraktion, Amplifikation und Detektion durchläuft (DIN, 2005a).

In der vorliegenden Studie erwies sich das parallele Mitführen von externen homologen **Amplifikationskontrollen** mit einer definierten Menge extrahierter DNA von *C. coli* als wirksame Methode, um inhibitorische DNA-Extrakte sicher zu erkennen. Diese Vorgehensweise bietet gegenüber der Verwendung einer internen heterologen Amplifikationskontrolle (STRAUB et al., 1999; ANON., 2000) zwei wesentliche Vorteile. Einerseits gestaltete sich die Herstellung einer DNA-Lösung definierter Konzentration wesentlich einfacher und schneller als die Amplifizierung und Aufreinigung eines heterologen Fragments des pUC18-Plasmids. Zum anderen muss die Konzentration des internen Standards im PCR-Reaktionsansatz aufwändig optimiert werden, um eine kompetitive Hemmung der Amplifikation durch die Coamplifikation des Kontrollsystems zu verhindern.

6 Zusammenfassung

Thermotolerante *Campylobacter* spp. gehören in Deutschland zu den häufigsten Erregern bakterieller Enteritiden beim Menschen. Der Erreger wird hauptsächlich durch kontaminierte Lebensmittel, zumeist Geflügelprodukte übertragen. Die kulturelle Isolierung aus Lebensmitteln bereitet - insbesondere wegen der hohen Wachstumsansprüche und Empfindlichkeit des Keimes - häufig Probleme, was sich auch in der Vielzahl der entwickelten Verfahren ausdrückt. Eine erste Normierung für den kulturellen Nachweis erfolgte auf internationaler Ebene mit der Veröffentlichung der ISO 10272:1995 (E), die zwei optionale Anreicherungsverfahren beschreibt.

Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde der Einfluss verschiedener kultureller Anreicherungsverfahren in Anlehnung an die ISO 10272:1995 (E) auf die Isolierungsrate von *Campylobacter* spp. bei natürlich kontaminierten frischen und tiefgefrorenen Geflügelfleischprodukten untersucht. Ferner wurde die Notwendigkeit einer Blut-Supplementation der Preston-Bouillon sowie der Effekt unterschiedlicher Inkubationszeiten überprüft.

Mit den beiden Anreicherungsverfahren nach ISO 10272:1995 (E), d.h. der Preston-Bouillon und der Park und Sanders-Bouillon, konnten aus insgesamt 80 (52 %) der 153 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. isoliert werden. Die höchsten Nachweisraten ergaben sich für Geflügelinnereien (65 %), gefolgt von Geflügelfleisch (48 %) und Geflügelfleischzubereitungen (20 %). Bei tiefgefrorenen Produkten wurden insgesamt höhere Prävalenzen ermittelt (58,4 %) als bei frisch angebotener Ware (43,8 %). Unter Verwendung von Preston-Bouillon konnten aus 77 Proben (50 %) und mit dem Selektivmedium nach Park und Sanders aus 76 Proben (50 %) *Campylobacter* spp. isoliert werden.

Hinsichtlich der Methodik lassen sich folgende **Schlussfolgerungen** ziehen:

1. Mit beiden Anreicherungsverfahren wurden in Geflügelfleischproben vergleichbare Prävalenzen ermittelt. Daher ist für die Untersuchung von frischen und tiefgefrorenen Geflügelfleischprodukten das Anreicherungsverfahren nach Preston wegen des geringeren Material-, Zeit- und Arbeitsaufwandes der Park und Sanders-Anreicherung vorzuziehen.
2. Die Nachweisrate wurde durch die unterschiedliche Inkubationsdauer (22 ± 2 h oder 46 ± 2 h) nicht beeinflusst.
3. Bei Verwendung von frisch hergestellter Preston-Bouillon (maximal 3 Tage alt) ist eine Blutsupplementation nicht unbedingt erforderlich.

Darüber hinaus zeigen die quantitativen Untersuchungen, dass 22,5 % der *Campylobacter*-positiven Proben mit beachtlichen Keimzahlen zwischen $\log 3,3$ und $\log 4,1$ KbE/Oberfläche kontaminiert sind. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Geflügelinnereien.

Da sowohl in der amtlichen Routinediagnostik als auch in der Lebensmittelwirtschaft der Wunsch nach schnellen Screeningmethoden stetig zunimmt, wurden **im zweiten Teil der vorliegenden Studie** zwei PCR-Verfahren hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten in der lebensmittelhygienischen Routinediagnostik überprüft. Für diesen Zweck wurde eine Vergleichsuntersuchung von 80 natürlich kontaminierten Geflügelfleischproben durchgeführt, wobei das seminested PCR-System nach WEGMÜLLER et al. (1993) und die pg50/pg3-PCR nach OYOFO et al. (1992) mit dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 10272:1995 (E) (Preston-Protokoll) hinsichtlich der Sensitivität und der Spezifität getestet wurden.

Mit dem kulturellen Referenzverfahren nach ISO 10272:1995 (E) und dem seminested PCR-System nach WEGMÜLLER et al. (1993) konnten jeweils in 44 von 80 Proben thermotolerante *Campylobacter* spp. bzw. spezifische Gensequenzen nachgewiesen werden. Dagegen wurden mit dem pg50/pg3-PCR-System nach

OYOFO et al. (1992) 43 positive, ein falsch-negatives und 5 falsch-positive Ergebnisse erzielt, so dass sich eine relative Sensitivität von 97,7 % und eine relative Spezifität von 86,1 % ergaben. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass die 5 falsch-positiven Befunde nicht durch eine Hybridisierung bestätigt worden waren.

Aus den Ergebnissen dieser Verfahrensvergleichsuntersuchung lassen sich folgende **Schlussfolgerungen** ziehen:

1. Die seminested PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993) ist aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität als schnelles Screeningverfahren für den Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch geeignet. Sie bietet allerdings nicht die Möglichkeit zur Automatisierung und gestattet auch keine Speziesdifferenzierung zwischen *C. jejuni* und *C. coli*.
2. Beim Einsatz der pg50/pg3-PCR nach OYOFO et al. (1992) ist es zwingend erforderlich, durch eine abschließende Hybridisierung die Identität der nachgewiesenen PCR-Produkte zu bestätigen, um die Sensitivität und vor allem die Spezifität des Systems zu erhöhen.
3. Im lebensmittelhygienischen Routinelabor, in dem zwar die PCR, nicht aber die Southernblot-Hybridisierung apparativ und personell etabliert ist, stellt die seminested PCR eine Alternative zur vorläufigen amtlichen Methode nach § 64 LFGB (BVL, 2006) dar.
4. Durch das parallele Mitführen von externen Amplifikationskontrollen können falsch-negative Ergebnisse aufgrund inhibitorischer DNA-Extrakte zuverlässig vermieden werden.
5. Mit dem kommerziellen DNA-Extraktionskit (DNeasy™ Tissue Kit, Fa. Qiagen) lässt sich *Campylobacter*-DNA im Routinelabor schnell und effektiv aus Geflügelfleisch und -innereien extrahieren.

7 Summary

Comparative studies on the cultural and molecular biological detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. in poultry

Thermotolerant *Campylobacter* spp. belong to the most frequent causative organisms of bacterial enteritis in man. The pathogen is transmitted mainly by contaminated food, especially poultry products. Because of the high growth requirements and the sensitivity of the microorganism, the cultural isolation from food is often difficult, a fact which leads to the development of a large number of methods. A first international standardization of the cultural detection method took place with the publication of ISO 10272:1995 (E) which describes two optional enrichment methods.

In the first part of the study the influence of different cultural enrichment methods according to ISO 10272:1995 (E) on the isolation rate of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated fresh and frozen poultry products was investigated. Furthermore the necessity of blood supplementation of the Preston broth and the effect of different incubation times were tested.

With the enrichment procedures according to ISO 10272:1995 (E) (Preston broth and Park and Sanders broth) thermotolerant *Campylobacter* spp. could be isolated from 80 (52 %) of 153 samples. The highest detection rate was determined for poultry offal (65 %), followed by poultry meat (48 %) and poultry meat preparations (20 %). Frozen products showed higher prevalence rates (58,4 %) than fresh products (43,8 %). Using Preston broth 77 samples (50 %) were found *Campylobacter* spp.-positive, whereas 76 samples were *Campylobacter* spp.-positive when Park and Sanders broth was used.

The following **conclusions** can be drawn from the comparison of the cultural detection methods:

1. The two enrichment procedures performed equally well in the detection of *Campylobacter* spp. in poultry samples. So the Preston protocol should be preferred to the Park and Sanders method for the examination of fresh and frozen poultry meat because it is less labour intensive, and less material and time consuming.
2. The detection rate was not influenced by incubation time (22 ± 2 h or 46 ± 2 h).
3. A blood supplementation is not generally required when freshly produced Preston broth is used.

Furthermore the quantitative examination revealed that 22,5 % of the *Campylobacter* positive samples, especially poultry offal, were contaminated with high population levels from log 3,3 to log 4,1 cfu/surface.

In the second part of the study two PCR-assays were compared for their suitability in routine food-examination. For this, 80 naturally contaminated poultry samples were analysed for *Campylobacter* spp. using the seminested PCR assay of WEGMÜLLER et al. (1993), the pg50/pg3-PCR of OYOFO et al. (1992) and the cultural reference method according to ISO 10272:1995 (E) (Preston protocol), with regard to the sensitivity and specificity of the PCR assays.

44 of 80 samples were positive for *Campylobacter* spp. and specific gene sequence using the cultural reference method according to ISO 10272:1995 (E) and the seminested PCR-System of WEGMÜLLER et al. (1993), respectively. The use of the pg50/pg3-PCR of OYOFO et al. (1992) yielded 43 positive, 1 false-negative and 5 false-positive results. The relative sensitivity and specificity rate was calculated to be 97,7 % and 86,1 %, respectively, although considering that the 5 false-positive results were not confirmed by hybridization.

The following **conclusions** can be drawn from the results comparing the PCR-detection methods:

1. The rapid and sensitive seminested PCR assay of WEGMÜLLER et al. (1993) provides a suitable tool for specific detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. in poultry. But there is no possibility for automation and for differentiation of the species *C. jejuni* und *C. coli*.
2. The pg50/pg3-PCR assay (OYOFO et al., 1992) isn't a useful screening method because there is a strong necessity to verify the obtained amplicons by southernblot-hybridization in order to increase sensitivity and specificity.
3. For laboratories, which have not established hybridization technique yet, the seminested PCR assay fulfils the necessity to verify the amplicons (DIN, 2006b) and provides therefore an alternative to the published provisional method according to § 64 LFGB (BVL, 2006).
4. To avoid false-negative results, extern amplification controls are reliable tools.
5. The commercially available DNA-Extraction kit used in this study (DNeasy™ Tissue Kit, Qiagen) facilitates rapid and effective extraction of bacterial DNA out of the tested food matrix (poultry).

8 Literaturverzeichnis

- ABU-RUWAIDA, A.S., SAWAYA, W.N., DASHTI, B.H., BAROON, Z.H., AL-OTHMAN, H.A. (1996):
Microbiological shelf-life and quality of frozen broiler chickens stored under simulated market temperatures.
Fleischwirtschaft 76, 652-656
- ADAK, G.K., COWDEN, J.M., NICHOLAS, S., EVANS, H.S. (1995):
The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of *Campylobacter* infection.
Epidemiol. Infect. 115, 15-22
- ALBERT, M.J., TEE, W., LEACH, A.S., ASCHE, V., PENNER, J.L. (1992):
Comparison of a blood-free medium and a filtration technique for the isolation of *Campylobacter* spp. from diarrhoeal stools of hospitalised patients in central Australia.
J. Med. Microbiol. 37, 176-179
- ALLERBERGER, F., AL-JAZRAWI, N., KREIDL, P., DIERICH, M. P., FEIERL, G., HEIN, I., WAGNER, M. (2003):
Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis.
Infect. 31, 19-23
- ALLMANN, M., HÖFELEIN, C., KÖPPEL, E., LÜTHY, J., MEYER, R., NIEDERHAUSER, C., WEGMÜLLER, B., CANDRIAN, U. (1995):
Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products.
Res. Microbiol. 146, 85-97
- ALTEKRUSE, S.F., HUNT, J.M., TOLLEFSON, L.K., MADDEN, J.M. (1994):
Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection.
JAVMA 204, 57-61
- ALTEKRUSE, S.F., STERN, N.J., FIELDS, P.I., SWERDLOW, D.L. (1999):
Campylobacter jejuni - an emerging food-borne pathogen.
Emerg. Infect. Dis. 5, 28-35
URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no1/altekruse.htm>
- ALTER, T., GÜRTLER, M., GAULL, F., JOHNE, A., FEHLHABER, K. (2004):
Comparative analysis of the prevalence of *Campylobacter* spp. in retail turkey.
Arch. Lebensmittelhyg. 55, 60-63
- ALTWEGG, M., BURNENS, A., ZOLLINGER-ITEN, J., PENNER, J.L. (1987):
Problems in identification of *Campylobacter jejuni* associated with acquisition of resistance to nalidixic acid.
J. Clin. Microbiol. 25, 1807-1808
- ANNABLE, M.J., MARSHALL, A.D., SILLEY, P. (1998):
Optimisation of incubation atmosphere for the growth of *Campylobacter* spp. and of *Helicobacter pylori*.
Arch. Lebensmittelhyg. 49, 118-119
- ANONYMUS (1998a):
DNA-Technology. In: Simons, K. und Kurzchalia, T. (Hrsg.): Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-VCH Verlag, 2. korr. Aufl., Weinheim. 333-368

ANONYMUS (1998b):

Campylobacter. In: Hartung, M. (Hrsg.): Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonose-RL (92/117/EWG). 19, 27 ff, 90ff

ANONYMUS (2000):

Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln durch Amplifizierung spezifischer Gensequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion. Bundesgesundheitsbl. 43, 816-824

ARCHER, D.L. (2004):

Freezing: an underutilized food safety technology? Int. J. Food Microbiol. 90, 127-138

ATABAY, H.I. und CORRY, J.E.L. (1997):

The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. J. Appl. Microbiol. 83, 619-626

BACON, D.J., ALM, R.A., BURR, D.H., HU, L., KOPECKO, D.J., EWING, C.P., TRUST, T.J., GUERRY, P. (2000):

Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect. Immun. 68, 4384-4390

BAFFONE, W., CASAROLI, A., CITTERIO, B., PIERFELICI, L., CAMPYNA, R., VITTORIA, E., GUAGLIANONE, E., DENELLI, G. (2006):

Campylobacter jejuni loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. Int. J. Food Microbiol. 107, 83-91

BÄR, W. und FRICKE, G. (1987):

Rapid and improved gas-liquid chromatography technique for detection of hippurat hydrolysis by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J. Clin. Microbiol. 25, 1776-1778

BAUMGART, J. und BECKER, B. (2004):

Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 5., aktualisierte und erw. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg

BAUMGARTNER, A., GRAND, M., LININGER, M., SIMMEN, A. (1995):

Campylobacter contaminations of poultry liver - consequences for food handlers and consumers. Arch. Lebensmittelhyg. 46, 11-12

BAYLIS, C.L., MACPHEE, S., MARTIN, K.W., HUMPHREY, T.J., BETTS, R.P. (2000):

Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. J. Appl. Microbiol. 89, 884-891

BEAN, N.H., GOULDING, J.S., LAO, C., ANGULO, F.J. (1996):

Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, 1988-1992. Morb. Mort. Wkly. Rep. 45, 16-20 (zitiert nach SMITH, 1998)

BEERY, J.T., HUGDAHL, M.B., DOYLE, M.P. (1988):

Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 2365-2370

BERNDTSON, E., DANIELSSON-THAM, M. L., ENGVALL, A. (1992):

Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. Int. J. Food Microbiol. 15, 45-50

BERRANG, M.E., SMITH, D.P., WINDHAM, W. R., FELDNER, P.W. (2004):

Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. J. Food Protect. 67, 235-238

- BERTHELET, M., WHYTE, L.G., GREER, C.W. (1996):
Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinyl-polypyrrolidone spin columns.
FEMS Microbiol. Lett. 138, 17-22
- BEST, E.L., POWELL, E.J., SWIFT, C., GRANT, K.A., FROST, J.A. (2003):
Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates.
FEMS Microbiol. Lett. 229, 237-241
- BEUCHAT, L.R. (1985):
Efficacy of media and methods for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in refrigerated chicken meat.
Appl. Environ. Microbiol. 50, 934-939
- BEUCHAT, L. R. (1987):
Efficacy of some methods and media for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in frozen chicken meat.
J. Appl. Bacteriol. 62, 217-221
- BHADURI, S. und COTTRELL, B., (2004):
Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 7103-7109
- BIRKENHEAD, D., HAWKEY, P.M., HERITAGE, J., GASCOYNE-BINZI, D.M., KITE, P. (1993):
PCR for the detection and typing of campylobacters.
Lett. Appl. Microbiol. 17, 235-237
- BIRKHEAD, G., VOGT, R.L., HEUN, E., EVELTI, C.M., PATTON, C.M. (1988):
A multiple-strain outbreak of campylobacter enteritis due to the consumption of inadequately pasteurized milk.
J. Inf. Dis. 157, 1095-1097
- BISWAS, D., ITOH, K., SASAKAWA, C. (2003):
Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*.
Microbiol. Immunol. 47, 469-473
- BLACK, R.E., LEVINE, M.M., CLEMENTS, M.L., HUGHES, T.P., BLASER, M.J. (1988):
Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans.
J. Inf. Dis. 157, 472-479
- BLANKENSHIP, L.C. und CRAVEN, S.E. (1982):
Campylobacter jejuni survival in chicken meat as a function of temperature.
Appl. Environ. Microbiol. 44, 88-92
- BLASER, M.J., HARDESTY, H.L., POWERS, B., WANG, W.-L.I. (1980):
Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus.
J. Clin. Microbiol. 11, 309-313
- BLASER, M.J., WALDMAN, R.J., ERLANDSON, A.L. (1981):
Outbreaks of *Campylobacter* enteritis in two extended families: evidence for person-to-person transmission.
J. Pediatr. 98, 254-257 (zitiert nach KIST, 2002)
- BLASER, M.J., TAYLOR, D.N., FELDMAN, R.A. (1983):
Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections.
Epidemiol. Rev. 5, 157-176

- BLASER, M.J., SAZIE, E., WILLIAMS, L.P.J. (1987):
The influence of immunity on raw milk-associated *Campylobacter* infection.
JAMA 257, 43-46
- BLOOMFIELD, S.F. (2003):
Home hygiene: a risk approach.
Int. J. Hyg. Environ. Health. 206, 1-8
- BOLTON, F.J., HOLT, A.V., HUTCHINSON, D.N. (1984):
Campylobacter biotyping scheme of epidemiological value.
J. Clin. Pathol. 37, 677-681
- BOLTON, F.J., COATES, D., HUTCHINSON, D.N., GODFREE, A.F. (1987):
A study of thermophilic *Campylobacter* in a river system.
J. Appl. Bacteriol. 62, 167-176
- BOLTON, F.J., SURMAN, S.B., MARTIN, K., WAREING, D.R.A., HUMPHREY, T.J. (1999):
Presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in sand from bathing beaches.
Epidemiol. Infect. 122, 7-13
- BOLTON, F.J., SAILS, A.D., FOX, A.J., WAREING, D.R.A., GREENWAY, D.L.A. (2002):
Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Food Prot. 65, 760-767
- BRANDL, M.T., HAXO, A.F., BATES, A.H., MANDRELL, R.E. (2004):
Comparison of survival of *Campylobacter jejuni* in the phyllosphere with that in the rhizosphere of spinach and radish plants.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 1182-1189
- BRECHTEL, C., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (2002):
Zur Qualitätskontrolle des Sortiments eines Tiefkühlkost-Vertriebes hinsichtlich der *Campylobacter*-Kontamination.
43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 24.-27. September 2002, 784-786
- BRENNHOVD, O., KAPPERUD, G., LANGELAND, G. (1991):
Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp., and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway.
Int. J. Food Microbiol. 15, 327-338
- BROWN, P., KIDD, D., RIORDAN, T., BARELL, R.A. (1988):
An outbreak of foodborne *Campylobacter jejuni* infection and the possible role of cross-contamination.
J. Infect. 17, 171-176
- BUCK, G.E., FOJTASEK, C., CALVERT, K., KELLY, M.T. (1982):
Evaluation of the CampyPak-II Gas Generator System for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*.
J. Clin. Microbiol. 15, 41-42
- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL) (2006):
Untersuchung von Lebensmitteln – Qualitativer Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Lebensmitteln durch Amplifizierung spezifischer Gensequenzen mit der PCR, L 00.00-96(V) (Dezember 2006). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Beuth Verlag, Berlin

- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL) (2007):
Untersuchung von Lebensmitteln – Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln, L 00.00-107 (April 2007). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Beuth Verlag, Berlin
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2005):
Campylobacteriose durch Hähnchenfleisch – Eine quantitative Risikoabschätzung. In: LUBER, P., und BARTELT, E. (Hrsg.), Heft BfR-Wissenschaft, 03/2005. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2006a):
Entwicklung von Handlungsoptionen zur Reduzierung von *Campylobacter* spp. im Geflügelbereich. Kurzprotokoll eines Sachverständigengesprächs im BfR am 3. Juli 2006.
URL: http://www.bfr.bund.de/cm/208/entwicklung_von_handlungsoptionen_zur_reduzierung_von_campylobacter_spp_im_gefluegelbereich.pdf
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2006b):
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2004.
In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Heft BfR-Wissenschaft, 04/2006. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.
URL: http://www.bfr.bund.de/cm/238/epidemiologische_situation_der_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2004.pdf
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2006c):
Campylobacter bei Geflügel: Überblick über angewandte Nachweismethoden und die derzeitige Datenlage. Kurzprotokoll des 2. Sachverständigengesprächs im BfR am 12. Dezember 2006.
URL: http://www.bfr.bund.de/cm/208/campylobacter_bei_gefluegel_ueberblick_ueber_angewandte_nachweismethoden_und_die_derzeitige_datenlage.pdf
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2007):
Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2005.
In: HARTUNG, M. (Hrsg.), Heft BfR-Wissenschaft, 03/2007. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin.
URL: http://www.bfr.bund.de/cm/238/epidemiologische_situation_der_zoonosen_in_deutschland_im_jahr_2005.pdf
- BURGESS, F., LITTLE, C.L., ALLEN, G., WILLIAMSON, K., MITCHELL, R.T. (2005):
Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the external packaging of raw meat.
J. Food. Prot. 68, 469-475
- BUSWELL, C., HERLIHY, Y.M., LAWRENCE, L.M., MCGUIGGAN, J.T.M., MARSH, P.D., KEEVIL, C.W., LEACH, S.A. (1998):
Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA staining.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 733-741
- BUTLER, R.C., LUND, V., CARLSON, D.A. (1987):
Susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Yersinia enterocolitica* to UV radiation.
Appl. Environ. Microbiol. 53, 375-378
- BUTZLER, J.P. und OOSTEROM, J. (1991):
Campylobacter: pathogenicity and significance in foods.
Int. J. Food Microbiol. 12, 1-8

- CABRITA, J., RODRIGUES, J., BRAGANDA, F., MORGADO, C., PIRES, I., PENHA GONZCALVES, A. (1992):
Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from Northeast Portugal.
J. Appl. Bacteriol. 73, 279-285
- CASON, J.A. und BERRANG, M.E. (2002):
Variation in numbers of bacteria on paired chicken carcass halves.
Poultry Science 81, 126-133
- CDC (2002):
Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program-Wisconsin, USA, 2001.
Morb. Mort. Wkly. Rep. 51, 548-549
- CHAI, L.C., ROBIN, T., RAGAVAN, U.M., GUNSALAM, J.W., BAKAR, F.A., GHAZALI, F.M., RADU, S., KUMAR, M.P. (2007):
Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia.
Int. J. Food Microbiol. 117, 106-111
- CHAN, K.F., LE TRAN, H., KANENAKA, R.Y., KATHARIOU, S. (2001):
Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 degree C).
Appl. Environ. Microbiol. 67, 4186-4191
- CHANTARAPANONT, W., BERRANG, M., FRANK, J.F. (2003):
Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin.
J. Food Protect. 66, 2222-2230
- CHAVEERACH, P., TER HUURNE, A.A.H.M., LIPMAN, L.J.A., VAN KNAPEN, F. (2003):
Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 711-714
- CHEN, Y., JACKSON, K.M., CHEA, F.P., SCHAFFNER, D.W. (2001):
Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks.
J. Food Prot. 64, 72-80
- CHUMA, T., YANO, K., OMORI, H., OKAMOTO, K., YUGI, H. (1997):
Direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents by PCR.
J. Vet. Med. Sci. 59, 85-87
- COGAN, T.A., BLOOMFIELD, S.F., HUMPHREY, T.J. (1999):
The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen.
Lett. Appl. Microbiol. 29, 354-358
- COGAN, T.A., SLADER, J., BLOOMFIELD, S.F., HUMPHREY, T.J. (2002):
Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures.
J. Appl. Microbiol. 92, 885-892
- COKER, A.O., ISOKPEHI, R.D., THOMAS, B.N., AMISU, K.O., OBI, C.L. (2002):
Human Campylobacteriosis in developing countries.
Emerg. Infect Dis. 8, 237-243

- CORRY, J.E.L. (1999):
Detection by cultural and modern techniques. In: Encyclopedia of food microbiology:
ROBINSON, R.K., BATT, C.A., PATEL, P.D. (eds.), Academic Press, San Diego, CA, 341-347
- CORRY, J.E.L. und ATABAY, H.I. (2001):
Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms.
J. Appl. Microbiol. 90, 96S-114S
- CORRY, J.E.L., POST, D.E., COLIN, P., LAISNEY, M.J. (1995):
Culture media for the isolation of campylobacters.
Int. J. Food Microbiol. 26, 43-76
- CORRY, J.E.L., ATABAY, H.I., FORSYTHE, S.J., MANSFIELD, L.P. (2003):
Chapter 18: Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters. In:
CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W., BAIRD, R.M. (eds.), Handbook of culture media for food microbiology. Volume 37, Elsevier Science B.V., Amsterdam, NL, 271-316
- CRUSHELL, E., HARTY, S., SHARIF, F., BOURKE, B. (2004):
Enteric *Campylobacter* : Purging its secrets?
Pediatr. Res. 55, 3-12
- DE BOER, E. und BEUMER, R.R. (1999):
Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms.
Int. J. Food Microbiol. 50, 119-130
- DE BOER, E. und HAHNE, M. (1990):
Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken produkts during food preparation.
J. Food Prot. 53, 1067-1069
- DE BOER, E. und HUMPHREY, T.J. (1991):
Comparison of methods for the isolation of thermophilic *Campylobacters* from chicken products.
Microb. Ecol. Health Dis. 4 (Special issue), S43 (zitiert nach CORRY et al., 1995)
- DEMING, M.S., TAUXE, R.V., BLAKE, P.A., DIXON, S.E., FOWLER, B.S., JONES, T.S., LOCKAMY, E.A., PATTON, C.M., SIKES, R.O. (1987):
Campylobacter enteritis at an university: transmission from eating chicken and from cats.
Am. J. Epidemiol. 126, 526-534
- DENIS, M., SOUMET, C., RIVOAL, K., ERMEL, G., BLIVET, D., SALVAT, G., COLIN, P. (1999):
Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *C. jejuni* and *C. coli*.
Lett. Appl. Microbiol. 29, 406-410
- DENIS, M., REFREGIER-PETTON, J., LAISNEY, M. J., ERMEL, G., SALVAT, G. (2001):
Campylobacter contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
J. Appl. Microbiol. 91, 255-267
- DENTON, K.J. und CLARKE, T. (1992):
Role of *Campylobacter jejuni* as a placental pathogen.
J. Clin. Pathol. 45, 171-172
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (1998):
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine methodenspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion. DIN 10134:1998, Beuth Verlag, Berlin.

- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (2005a):
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln. DIN EN ISO 22174:2005, Beuth Verlag, Berlin.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (2005b):
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln - Leistungsprüfung für PCR-Geräte. DIN CEN ISO/TS 20836:2005, Beuth Verlag, Berlin.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (2006a):
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). DIN EN ISO 20837:2006, Beuth Verlag, Berlin.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (DIN) (2006b):
Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Anforderungen an die Amplifikation und den Nachweis bei qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). DIN EN ISO 20838:2006, Beuth Verlag, Berlin.
- DOCHERTY, L.M., ADAMS, R., PATEL, P., MCFADDEN, J. (1996):
The magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry.
Lett. Appl. Microbiol. 22, 288-292
- DOMÍNGUEZ, C., GÓMEZ, I., ZUMALACÁRREGUI, J. (2002):
Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain.
Int. J. Food Microbiol. 72, 165-168
- DONACHIE, S.P., BOWMAN, J.P., ON, S.L.W., ALAM, M. (2005):
Arcobacter halophilus sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*.
J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1271-1277
- DOYLE, M.P. und ROMAN, D.J. (1981):
Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH.
J. Food Prot. 44, 596-601
- DOYLE, M.P. und ROMAN, D.J. (1982a):
Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying.
J. Food Prot. 45, 507-510
- DOYLE, M.P. und ROMAN, D.J. (1982b):
Response of *Campylobacter jejuni* to Sodium Chloride.
Appl. Environ. Microbiol. 43, 561-565
- DOYLE, M.P. und SCHOENI, J.L. (1986):
Isolation of *Campylobacter jejuni* from retail mushrooms.
Appl. Environ. Microbiol. 51, 449-450
- DUFRENNE, J., RITMEESTER, W., DELFGOU-VAN ASCH, E., VAN LEUSDEN, F., DE JONGE, R. (2001):
Quantification of the contamination of chicken and chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*.
J. Food Protect. 64, 538-541
- ELMER-ENGELHARD, D., KNOLL-SAUER, M., BECK, H. (1998):
Untersuchung von Geflügelfleisch auf thermophile *Campylobacter*. Verbessertes Nachweisverfahren durch eine modifizierte Preston-Anreicherung in Kombination mit Membranfiltration. Erfahrungen mit dem VIDAS-System als Screening-Methode. 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, Garmisch-Partenkirchen, 22.9.-25.9.1998, 401-406

EFSA (2005):

Trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the european union in 2004.

The EFSA Journal 310, 1-275

URL: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Report/zoonoses2004-levels1-2-part11,6.pdf>

URL: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Report/zoonoses2004-levels1-2-part21,6.pdf>

EFSA (2006):

Trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the european union in 2005.

The EFSA Journal 94, 2-288

URL: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Zoonoses_Report_EU_en_2005,3.pdf

ELSON, R., BURGESS, F., LITTLE, C.L., MITCHELL, R.T. (2004):

Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pâté from catering and retail premises in the UK.

J. Appl. Microbiol. 96, 499-509

ENDTZ, H.P., RUIJS, G.J.H.M., ZWINDERMAN, A.H., VAN DER REIJDEN, T., BIEVER, M., MOUTON, R.P. (1991a):

Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens.

J. Clin. Microbiol. 29, 1007-1010

ENDTZ, H.P., RUIJS, G.J., VAN KLINGEREN, B., JANSEN, W.H., VAN DER REYDEN, T., MOUTON, R.P. (1991b):

Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine.

J. Antimicrob. Chemother. 27, 199-208

ENDTZ, H.P., Vliegenthart, J.S., Vandamme, P., Weverink, H.W., Van den Braak, N.P., Verbrugh, H.A. (1997):

Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands.

Int. J. Food Microbiol. 34, 79-88

ENDTZ, H.P., ANG, C.W., VAN DEN BRAAK, N., DUIM, B., RIGHTER, A., PRICE, L.J., RODGERS, F.G., JOHNSON, W.M., WAGENAAR, J.A., JACOBS, B.C., VERBRUGH, H.A., VAN BELKUM, A. (2000):

Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barré and Miller Fisher Syndromes.

J. Clin. Microbiol. 38, 2297-2301

ENGBERG, J., ON, S.L.W., HARRINGTON, C.S., GERNER-SCHMIDT, P. (2000):

Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for campylobacters.

J. Clin. Microbiol. 38, 286-291

ENGLER, M.D und KELLY, L.C. (2000):

A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction.

Lett. Appl. Microbiol. 31, 421-426

EVANS, M.R., ROBERTS, R.J., RIBEIRO, C.D., GARDNER, D., KEMBREY, D. (1996):

A milk-borne *Campylobacter* outbreak following an educational farm visit.

Epidemiol. Infect. 117, 457-462

EVANS, M.R., LANE, W., FROST, J.A., NYLEN, G. (1998):

A campylobacter outbreak associated with stir-fried food.

Epidemiol. Infect. 121, 275-279

- EVANS, M.R., RIBEIRO, C.D., SALMON, R.L. (2003):
Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for campylobacter infection.
Emerg. Infect. Dis. 9, 1219-1225
- EVEREST, P.H., GOOSEBS, H., BUTZLER, J.P., LLOYD, D., KNUTTON, S., KETLEY, J.M., WILLIAMS, P.H. (1992):
Differentiated caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
J. Med. Microbiol. 37, 319-325
- FAHEY, T., MORGAN, D., GUNNEBURG, C., ADAK, G.K., MAJID, F., KACZAMARSKI, E. (1995):
An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurization.
J. Infect. 31, 137-143
- FAO/WHO (2003):
Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. In: Microbiological risk assessment series, No. 3. WHO library (zitiert nach BfR, 2005a)
- FEDERIGHI, M., MAGRAS, C., PILET, M.F., WOODWARD, D., JOHNSON, W., JUGIAU, F., JOUVE, J.L. (1999):
Incidence of thermotolerant *Campylobacter* in foods assessed by NF ISO 10272 standard: results of a two-year study.
Food Microbiol. 16, 195-204
- FEHLHABER, K. (1992):
Geflügel und Geflügelfleischprodukte. In: FEHLHABER, K., und JANETSCHKE, P. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 347-379
- FRIEDMAN, C.R., HOEKSTRA, R.M., SAMUEL, M., MARCUS, R., BENDER, J., SHIFERAW, B., REDDY, S., AHUJA, S.A., HELFRICK, D.L., HARDNETT, F., CARTER, M., ANDERSON, B., TAUXE, R.V. (2004):
Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case control study in FoodNet sites.
Clin. Infect. Dis. 38 (Suppl. 3), S285-S296
- FROST, J.A., OZA, A.N., THWAITES, R.T., ROWE, B. (1998):
Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens.
J. Clin. Microbiol. 36, 335-339
- GALLAY, A., DE VALK, H., COURNOT, M., LADEUIL, B., HEMERY, C., CASTOR, C., BON, F., MÉGRAUD, F., LE CANN, P., DESENCLOS, J.C. (2006):
A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000.
Clin. Microbiol. Infect. 12, 561-570
- GIESENDORF, B.A.J., QUNIT, W.G.V., HENKENS, M.H.C., STEGEMAN, H., HUF, F.A., NIESTERS, H.G.M. (1992):
Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol. 58, 3804-3808
- GILLESPIE, I.A., O'BRIEN, S.J., FROST, J.A., ADAK, G.K., HORBY, P., SWAN, A.V., PAINTER, M.J., NEAL, K.R. (2002):
A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses.
Emerg. Infect. Dis. 8, 937-942

- GONZALEZ, I., GRANT, K.A., RICHARDSON, P.T., PARK, S.F., COLLINS, M.D. (1997):
Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant.
J. Clin. Microbiol. 35, 759-763
- GOOSSENS, H., DE BOEK, M., COIGNAU, H., VLAES, L., VAN DEN BORRE, C., BUTZLER, J.-P. (1986):
Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp. from feces: Comparison with Preston Medium, a blood-free Medium, and a filtration system.
J. Clin. Microbiol. 24, 840-843
- GOOSSENS, H., VLAES, L., GALAND, I., VAN DEN BORRE, C., BUTZLER, J.-P. (1989):
Semisolid blood-free selective-motility medium for the isolation of *Campylobacters* from tool specimens.
J. Clin. Microbiol. 27, 1077-1080
- GORMAN, R., BLOOMFIELD, S., ADLEY, C.C. (2002):
A study of cross-contamination of foodborne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland.
Int. J. Food Microbiol. 76, 143-150
- GRAJEWSKI, B.A., KUSEK, J.W., GELFAND, H.M. (1985):
Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
J. Clin. Microbiol. 22, 13-18
- GRIFFITHS, A. und RIBEIRO, C.D. (1988):
Improved blood free selective medium for isolating *Campylobacter jejuni* from faecal specimens.
J. Clin. Pathol. 41, 704-705
- GUN-MUNRO, J., RENNIE, R.P., THORNLEY, J.H., RICHARDSON, H.L., HODGE, D., LYNCH, J. (1987):
Laboratory and clinical evaluation of isolation media for *Campylobacter jejuni*.
J. Clin. Microbiol. 25, 2274-2277
- HABIB, I., SAMPERS, I., UYTENDAELE, M., BERKVEN, D., DE ZUTTER, L. (2008):
Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat.
Food Microbiol. 25, 65-74
- HALD, B., SKOVGÅRD, H., BANG, D.D., PETERSEN, K., DYBAHL, J., JESPERSEN, J.B., MADSEN, M. (2004):
Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks.
Emerg. Infect. Dis. 10, 1490-1492
- HÄNEL, I. und SCHULZE, F. (1999):
Campylobacter jejuni - In vitro Untersuchungen zur Wirts-Zell-Interaktion.
Bundesgesundheitsbl. 43, 64-76
- HÄNEL, I., SCHULZE, F., HOTZEL, H., SCHUBERT, E. (1998):
Detection and characterization of two cytotoxins produced by *Campylobacter jejuni* strains.
Zbl. Bakt. 288, 131-143
- HARMON, K.M., RANSOM, G.M., WESLEY, I.V. (1997):
Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction.
Mol. Cell. Probes 11, 195-200
- HARRIGAN, W.F. (1998):
Incidents of food poisoning and food-borne diseases from „new“ or „unexpected“ causes: can they be prevented?
Int. J. Food Sci. Technol. 33, 177-189

- HARRIS, N.V., WEISS, N.S., NOLAN, C.M. (1986):
The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis.
Am. J. Public Health 76, 407-411
- HARRISON, W.A., GRIFFITH, C.J., TENNANT, D., PETERS, A.C. (2001):
Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging
in South Wales.
Lett. Appl. Microbiol. 33, 450-454
- HARVEY, S.M. (1980):
Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*.
J. Clin. Microbiol. 11, 435-437
- HARVEY, P., BATTLE, T., LEACH, S. (1999):
Different invasion phenotypes of *Campylobacter* isolates in caco-2 cell monolayers.
J. Med. Microbiol. 48, 461-469
- HEALING, T.D., GREENWOOD, M.H., PEARSON, A.D. (1992):
Campylobacters and enteritis.
Rev. Med. Microbiol. 3, 159-167
- HERNANDEZ, J., ALONSO, J.L., FAYOS, A., AMOROS, I., OWEN, R.J. (1995):
Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters.
FEMS Microbiol. Lett. 127, 201-206
- HILDEBRANDT, G. und SCHOTT, W. (2001):
Comparison of direct colony count methods and the MPN-method for quantitative detection of *Listeria* in model and field conditions.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114, 453-464
- HILL, W.E. (1996):
The polymerase chain reaction: applications for the detection of foodborne pathogens.
Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36, 123-173
- HODGE, J.P. und KRIEG, N.R. (1994):
Oxygen tolerance estimates in *Campylobacter* species depend on the testing medium.
J. Appl. Microbiol. 77, 666-673
- HOPKINS, R.S und SCOTT, A.S. (1983):
Handling raw chicken as a source for sporadic *Campylobacter jejuni* infections.
J. Infect. Dis. 148, 770
- HOPKINS, K.L., DESAI, M., FROST, J.A., STANLEY, J., LOGAN, J.M.J. (2004):
Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing.
J. Clin. Microbiol. 42, 229-235
- HÖRMAN, A., RIMHANEN-FINNE, R., MAUNULA, L., VON BONSDORFF, C.-H., TORVELA, N., HEIKINHEIMO, A., HÄNNINEN, M.-L. (2004):
Campylobacter spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 87-95
- HOUF, K., ON, S.L.W., COENYE, T., MAST, J., VAN HOOF, J., VANDAMME, P. (2005):
Arcobacter cibarius sp. nov., isolated from broiler carcasses.
J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 713-717

- HOUNG, H.-S.H., SETHABUTR, O., NIRDNOY, W., KATZ, D.E., PANG, L.W. (2001):
Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 40, 11-19
- HÜBNER, P., GAUTSCH, S., JEMMI, T. (2002):
In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren.
Mitt. Lebensm. Hyg. 93, 118-139
- HUGHES, R.A., HADDEN, R.D., GREGSON, N.A., SMITH, K.J. (1999):
Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome.
J. Neuroimmunol. 100, 74-97
- HUMPHREY, T. J. (1986):
Injury and recovery in freeze-or-heat damaged *Campylobacter jejuni*.
Lett. Appl. Microbiol. 3, 81-84
- HUMPHREY, T.J. und MUSCAT, I. (1989):
Incubation temperature and the isolation of *Campylobacter jejuni* from food, milk or water.
Lett. Appl. Microbiol. 9, 137-139
- HUNT, J.M. (1992):
Campylobacter. In: Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 7th ed.
AOAC International, Arlington, 77-94
- HUNT, J.M., ABEYTA, C., TRAN, T. (1998):
Campylobacter. In: Food and Drug Administration Bacteriological analytical manual, 8th ed., Rev.
A. AOAC International, Gaithersburg. 7.01-7.24, Appendix 3.11-3.15
- HUSSAIN, I., MAHMOOD, M.S., AKHTAR, M., KHAN, A. (2007):
Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan.
Food Microbiol. 24, 219-222
- HUYSMANS, M. B., TURNIDGE, J. D., WILLIAMS, J. H. (1995):
Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermo-
philic campylobacters.
J. Clin. Microbiol. 33, 3345-3346
- IJIMA, Y., ASAKO, N.T., AIHARA, M., HAYASHI, K. (2004):
Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a real-
time PCR assay.
J. Med. Microbiol. 53, 617-622
- IKRAM, R., CHAMBERS, S., MITCHELL, P., BRIESEMAN, M. A., IKRAM, O. H. (1994):
A case control study to determine factors for *Campylobacter* infection in christchurch in the summer
of 1992-93.
NZ Med. J. 107, 430-432
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) (1996):
Campylobacter.
In: Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Thompkin, R.B. (eds.), Microorganisms in Foods. 5 - Micro-
biological specifications of food pathogens, 1st ed., Blackie, London, 45-65
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (1995):
Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection of thermotolerant
Campylobacter. ISO 10272:1995 (E)

- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006A):
Microbiology of food and feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5°C-Part 1: Detection method. ISO 10272-1:2006
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006B):
Microbiology of food and feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5°C-Part 2: Colony-count technique. ISO/TS 10272-2:2006
- JACKSON, C.J., FOX, A.J., JONES, D.M., WAREING, D.R., HUTCHINSON, D.N. (1998):
Associations between heat-stable (O) and heat-labile (HL) serogroup antigens of *Campylobacter jejuni*: evidence for interstrain relationships within three O/HL-serovars.
J. Clin. Microbiol. 36, 2223-2228
- JENKS, P.J., BAILEY, D., WILSON, P. (1997):
Campylobacter bacteraemia - Can we improve our recognition of this clinical entity?
J. Inf. 35, 326-328
- JINNEMAN, K.C., TROST, P.A., HILL, W.E., WEAGANT, S.D., BRYANT, J.L., KAYSNER, C.A., WEKELL, M.M. (1995):
Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* Shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction.
J. Food Prot. 58, 722-726
- JONES, K. (2001):
Campylobacters in water, sewage and the environment.
J. Appl. Microbiol. 90, 68S-79S
- JONES, P.H., WILLIS, A.T., ROBINSON, D.A., SKIRROW, M.B., JOSEPHS, D.S. (1981):
Campylobacter enteritis associated with the consumption of free school milk.
J. Hyg. 87, 155-162
- JONES, K., BETAIEB, M., TELFORD, D.R. (1990):
Correlation between environmental monitoring of thermophilic campylobacters in sewage effluent and the incidence of *Campylobacter* infection in the community.
J. Appl. Bacteriol. 69, 235-240. zitiert nach JONES (2001)
- JONES, D.M., SUTCLIFFE, E.M., RIOS, R., FOX, A.J., CURRY, A. (1993):
Campylobacter jejuni adapts to aerobic metabolism in the environment.
J. Med. Microbiol. 38, 145-150
- JONES, I.G. und ROWORTH, M. (1996):
An outbreak of *E. coli* O157 and Campylobacteriosis associated with the contamination of drinking water supply.
Public Health 110, 277-282 (zitiert nach THOMAS et al., 1999)
- JØRGENSEN, F., BAILEY, R., WILLIAMS, S., HENDERSON, P., WAREING, D.R., BOLTON, F.J., FROST, J.A., WARD, L., HUMPHREY, T.J. (2002):
Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods.
Int. J. Food Microbiol. 76, 151-164
- JOSEFSEN, M.H., LÜBECK, P.S., AALBAEK, B., HOORFAR, J. (2002):
Preston and Park-Sanders protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse.
Int. J. Food Microbiol. 80, 177-183

- JOSEFSEN, M.H., COOK, N., D'AGOSTINO, M., HANSEN, F., WAGNER, M., DEMNEROVA, K., HEUVELINK, A.E., TASSIOS, P.T., LINDMARK, H., KMET, V., BARBANERA, M., FACH, P., LONCAREVIC, S., HOORFAR, J. (2004a):
Validation of a PCR-based method for detection of foodborne thermotolerant *Campylobacters* in a multicenter collaborative trial.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 4379-4383
- JOSEFSEN, M.H., LÜBECK, P.S., HANSEN, F., HOORFAR, J. (2004b):
Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples.
J. Microbiol. Methods 58, 39-48
- JOSEPHSON, K.L., GERBA, C.P., PEPPER, I.L. (1993):
Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3513-3515
- JOSHUA, G.W., GUTHRIE-IRONS, C., KARLYSHEV, A.V., WREN, B.W. (2006):
Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*.
Microbiology 152, 387-396
- KAAKOUSH, N.O., MILLER, W.G., DE REUSE, H., MENDZ, G.L. (2007):
Oxygen requirement and tolerance of *Campylobacter jejuni*.
Res. Microbiol. 158, 644-650
- KAPPERUD, G., SKJERVE, E., BEAN, N.H., OSTROFF, S.M., LASSEN, J. (1992):
Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway.
J. Clin. Microbiol. 30, 3117-3121
- KAPPERUD, G., ESPELAND, G., WAHL, E., WALDE, A., HERIKSTAD, H., GUSTAVSEN, S., TVEIT, I., NATAS, O., BEVANGER, L., DIGRANES, A. (2003):
Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway.
Am. J. Epidemiol. 158, 234-242
- KESSEL, A.S., GILLESPIE, I.A., O'BRIEN, S.J. (2001):
General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999.
Comm. Dis. Public. Health 4, 171-177
- KHAKHRIA, R. und LIOR, H. (1992):
Extended phage-typing scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
Epidemiol. Infect. 108, 403-414
- KIST, M. (1991):
Isolierung und Identifizierung von Bakterien der Gattungen *Campylobacter* und *Helicobacter*.
Zbl. Bakt. 276, 124-139
- KIST, M. (1996):
Campylobacter- und *Arcobacter*-Infektionen.
In: HOFMANN, F. (Hrsg.), Infektiologie (16. Erg.Lfg. 3/96), Kapitel IV – 1.5, Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, 1-8
- KIST, M. (2002):
Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*.
Bundesgesundheitsbl. 45, 497-506

- KLENA, J.D., PARKER, C.T., KNIBB, K., IBBITT, J.C., DEVANE, P.M.L., HORN, S.T., MILLER, W.G., KONKEL, M.E. (2004):
Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*.
J. Clin. Microbiol. 42, 5549-5557
- KOENRAAD, P.M.F.J., ROMBOUITS, F.M., NOOTERMANS, S.H.W. (1997):
Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: a review.
Water Environment Res. 69, 52-63
- KONKEL, M.E., MONTEVILLE, M.R., RIVERA-AMILL, V., JOENS, L.A. (2001):
The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis.
Curr. Issues Intest. Microbiol. 2, 55-71
- KOPECKO, D.J., HU, L., ZAAL, K.J.M. (2001):
Campylobacter jejuni – microtubule-dependent invasion.
Trends Microbiol. 9, 389-396
- KORHONEN, L.K. und MARTIKAINEN, P.J. (1991):
Comparison of the survival of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in culturable form in surface water.
Can. J. Microbiol. 37, 530-533
- KOROLIK, V., MOORTHY, L., COLOE, P.J. (1995):
Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction-
endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms.
J. Clin. Microbiol. 33, 1136-1140
- KOSUMANIGRUM, H.D., RIBOLDI, G., HAZELEGER, W.C., BEUMER, R.R. (2003):
Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods.
Int. J. Food Microbiol. 85, 227-236
- KRAMER, J.M., FROST, J.A., BOLTON, F.J., WAREING, D.R. (2000):
Campylobacter contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types
and comparison with isolates from human infection.
J. Food Protect. 63, 1654-1659
- KWIATEK, K., WOJTON, B., STERN, N.J. (1990):
Prevalence and distribution of *Campylobacter* spp. on poultry and selected red meat carcasses
in Poland.
J. Food Prot. 53, 127-130
- LAMOUREUX, M., MACKAY, A., MESSIER, S., FLISS, I., BLAIS, B.W., HOLLEY, R.A., SIMARD, R.E. (1997):
Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separation
and microtitre hybridization.
J. Appl. Microbiol. 83, 641-651
- LANTZ, P.G., HAHNHAGERDAHL, B., RADSTROM, P. (1994):
Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens.
Trends Food Sci. Technol. 5, 384-389
- LASTOVICA, A.J. und SKIRROW, M.B. (2000):
Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and
Campylobacter coli.
In: NACHAMKIN, I., and BLASER, M. J. (eds.): *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol., Washington
D.C, 121-128

- LAWSON, A.J., ON, S.L.W., LOGAN, J.M.J., STANLEY, J. (2001):
Campylobacter hominis sp. nov., from the human gastrointestinal tract.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 651-660
- LEDERGERBER, U., REGULA, G., STEPHAN, R., DANUSER, J., BISSIG, B., STÄRK, K.D.C. (2003):
Risk factors for antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. isolated from raw poultry meat in Switzerland.
BMC Public Health 3, 39
- LEE, A., SMITH, S.C., COLOE P.J. (1998):
Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions.
J. Food Prot. 61, 1609-1614
- LEE, A., SMITH, S.C., COLOE, P.J. (2000):
Detection of a novel campylobacter cytotoxin.
J. Appl. Microbiol. 89, 719-725
- LICK, S., MAYR, A., MÜLLER, M., ANDERSON, A., HOTZEL, H., HUBER, I. (2007):
Konventionelle PCR- und Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. lari*: ein Überblick.
J. Verbr. Lebensm. 2, 161-170
- LINDQVIST, R. (1997):
Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of *Escherichia coli* O157:H7.
Int. J. Food Microbiol. 37, 73-82
- LINDQVIST, R. und LINDBLAD, M. (2008):
Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. and cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden.
Int. J. Food Microbiol. 121, 41-52
- LINE, J.E. (2001):
Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp..
J. Food Prot. 64, 1711-1715
- LINE, J.E., STERN, N.J., LATTUADA, C.P., BENSON, S.T. (2001):
Comparison of methods for recovery and enumeration of *Campylobacter* from freshly processed broilers.
J. Food Protect. 64, 982-986
- LINTON, D., LAWSON, A.J., OWEN, R.J., STANLEY, J. (1997):
PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples.
J. Clin. Microbiol. 35, 2568-2572
- LIOR, H., WOODWARD, D.L., EDGAR, J.A., LAROCHE, L.J., GILL, P. (1982):
Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors.
J. Clin. Microbiol. 15, 761-768
- LOGAN, J.M.J., BURNENS, A., LINTON, D., LAWSON, A., STANLEY, J. (2000):
Campylobacter lanienae sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 865-872

- LÖSCHER, T. und HOELSCHER, M. (2002):
Reiseassoziierte Lebensmittelinfektionen.
Bundesgesundheitsbl. 45, 556-564
- LÜBECK, P.S. und HOORFAR, J. (2002):
PCR Technology and Applications to zoonotic food-borne bacterial pathogens. In: SACHSE, K., and FREY, J. (eds.), Methods Mol. Biol., vol. 216: PCR Technology for detection of foodborne pathogens. 65-84
- LÜBECK, P.S., WOLFFS, P., ON, S.L.W., AHRENS, P., RADSTRÖM, P., HOORFAR, J. (2003a):
Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: Assay development and analytical validation.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 5664-5669
- LÜBECK, P.S., COOK, N., WAGNER, M., FACH, P., HOORFAR, J. (2003b):
Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: Validation in a multicenter collaborative trial.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 5670-5672
- LUBER, P. (2004):
Entwicklung eines Mikrodilutions-Testsystems zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit bei enteropathogenen *Campylobacter* spp. und seine Anwendung zur Beschreibung der Epidemiologie des Auftretens resistenter Stämme in Geflügel Lebensmitteln und in humanem Untersuchungsmaterial. Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin, Deutschland (zitiert nach BfR, 2005a)
- LUBER, P. und BARTELT, E. (2007):
Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets.
J. Appl. Microbiol. 102, 313-318
- LUBER, P., SCHERER, K., BARTELT, E. (2005):
Kontamination von Hähnchenfleisch mit *Campylobacter* spp..
Fleischwirtsch. 85, 93-95
- LUBER, P., BRYNESTAD, S., TOPSCH, D., SCHERER, K., BARTELT, E. (2006):
Quantification of *Campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens.
Appl. Environ. Microbiol. 72, 66-70
- LUND M., WEDDERKOPP, A., WAINØ, M., NORDENTOFT, S., BANG, D.D., MADSEN, M. (2003):
Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark.
J. Appl. Microbiol. 94, 929-935
- MÄDE, D. und STARK, R. (2000):
Nachweis thermophiler *Campylobacter* in Lebensmitteln durch Polymerase-Kettenreaktion.
Arch. Lebensmittelhyg. 51, 8-12
- MALORNY, B., HOORFAR, J., HUGAS, M., HEUVELINK, A., FACH, P., ELLERBROEK, L., BUNGE, C., DORN, C., HELMUT, R. (2003):
Inter-laboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method.
Int. J. Food Microbiol. 89, 241-249
- MANZANO, M., PIPAN, C., BOTTA, G., COMI, G. (1995):
Polymerase chain reaction assay for detection of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in poultry meat.
Zbl. Hyg. 197, 370-386

- MARTIN, K.W., MATTICK, K.L., HARRISON, M., HUMPHREY, T.J. (2002):
Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B.
Lett. Appl. Microbiol. 34, 124-129
- MARTINEZ-RODRIGUEZ, A., MACKAY, B.M. (2005):
Factors affecting the pressure resistance of some *Campylobacter* species.
Lett. Appl. Microbiol. 41, 321-326
- MAZICK, A., ETHELBERG, S., NIELSEN, E.M., MOLBAK, K., LISBY, M. (2006):
An outbreak of Campylobacter jejuni associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005.
Euro Surveill. 11, 137-139
URL: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=622>
- MCKAY, D., FLETCHER, J., COOPER, P., THOMSON-CARTER, F.M. (2001):
Comparison of two methods for serotyping *Campylobacter* spp..
J. Clin. Microbiol. 39, 1917-1921
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L.F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999):
Food-related illness and death in the United States.
Emerg. Infect. Dis. 5, 607-625
- MEDEMA, G.J., TEUNIS, P.F.M., HAVELAAR, A.H., HAAS, C.N. (1996):
Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*.
Int. J. Food Microbiol. 30, 101-111
- MELBY, K., GONDROSEN, B., GREGUSSON, S., RIBE, H., DAHL, O.P. (1991):
Waterborne campylobacteriosis in northern Norway.
Int. J. Food Microbiol. 12, 151-156
- MELBY, K., SVENDBY, J. G., EGGEBO, T., HOLMEN, L. A., ANDERSEN, B. M., LIND, L., SJOGREN, E., KAIJSER, B. (2000):
Outbreak of *Campylobacter* infection in a subarctic community.
Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 19, 542-544
- MÉNARD, A., DACHET, F., PROUZET-MAULEON, V., OLEASTRO, M., MÉGRAUD, F. (2005):
Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp..
Clin. Microbiol. Infect. 11, 281-287
- MEYER, A., STALLMACH, T., GOLDENBERGER, D., ALTWEGG, M. (1997):
Lethal maternal sepsis caused by *Campylobacter jejuni*: pathogen preserved in placenta and identified by molecular methods. Mod. Pathol. 10, 1253-1256
- MILLER, I.S., BOLTON, F.J., DAWKINS, H.C. (1987):
An outbreak of *Campylobacter* enteritis transmitted by puppies.
Environ. Health 95, 11-14
- MOHRAN, Z.S., ARTHUR, R.R., OYOFO, B.A., PERUSKI, L.F., WASFY, M.O., ISMAIL, T.F., MURPHY, J.R. (1998):
Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as measured by PCR-detectable DNA.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 363-365
- MOLNAR, G.K., MERTSOLA, J., ERKKO, M. (1982):
Guillain-Barré Syndrome associated with *Campylobacter* infection.
Br. Med. J. 285, 652

- MOORE, J.E. und MADDEN, R.H. (2000):
The effect of thermal stress on *Campylobacter coli*.
J. Appl. Microbiol. 89, 892-899
- MOORHEAD, S.M. und DYKES, G.A. (2002):
Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage.
Lett. Appl. Microbiol. 34, 72-76
- MORAN, A.P. und UPTON, M.E. (1987):
Effect of medium supplements, illumination and superoxide dismutase on the production of coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428.
J. Appl. Bact. 62, 43-51
- MORENO, G.S., GRIFFITHS, P.L., CONNERTON, I.F., PARK, R.W.A. (1993):
Occurrence of campylobacters in small domestic and laboratory animals.
J. Appl. Bacteriol. 75, 49-54 (zitiert nach BAUMGART und BECKER, 2004)
- MORGAN, G., CHADWICK, P., LANDER, K.P., GILL, K.P.W. (1985):
Campylobacter mastitis in a cow: a zoonosis-related incident.
Vet. Rec. 116, 111
- MÜLLER, J., SCHULZE, F., MÜLLER, W., HÄNEL, I. (2006):
PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut.
Vet. Microbiol. 113, 123-129
- MOUWEN, D.J.M., WEIJTENS, M.J.B.M., CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., PRIETO, M. (2005):
Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
Appl. Environ. Microbiol. 71, 4318-4324
- MURPHY, C., CARROLL, C., JORDAN, K.N. (2006):
Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*.
Review. J. Appl. Microbiol. 100, 623-632
- NACHAMKIN, I. (2002): Chronic effects of *Campylobacter* infection.
Microbes Infect. 4, 399-403
- NACHAMKIN, I., ALLOS, B.M., HO, T. (1998):
Campylobacter species and Guillian-Barré Syndrome.
Clin. Microbiol. Rev. 11, 555-567
- NADEAU, É., MESSIER, S., QUESSY, S. (2002):
Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of Campylobacteriosis in humans.
J. Food Prot. 65, 73-78
- NANNAPANENI, R., STORY, R., WIGGINS, K.C., JOHNSON, M.G. (2005):
Concurrent quantitation of total *Campylobacter* and total ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* loads in rinses from retail raw chicken carcasses from 2001 to 2003 by direct plating at 42 degrees Celsius.
Appl. Environ. Microbiol. 71, 4510-4515
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS (NACMCF) (1994):
Campylobacter jejuni/coli.
J. Food Prot. 57, 1101-1121
- NEWELL, D. G. und FEARNLEY, C. (2003):
Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens.
Appl. Environ. Microbiol. 69, 4343-4351

- NEIMANN, J., ENGBERG, J., MOLBAK, K., WEGENER, H.C. (2003):
A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark.
Epidemiol. Infect. 130, 353-366
- NG, L.-K., KINGOMBE, C.I.B., YAN, W., TAYLOR, D.E., HIRATSUKA, K., MALIK, N., GARCIA, M.M. (1997):
Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4558-4563
- NICHOLS, G.L. (2005):
Fly transmission of *Campylobacter*.
Emerg. Infect. Dis. 11, 361-364
- NICHOLSEN, F.A., GROVES, S.J., CHAMBERS, B.J. (2005):
Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Biosource Technol.* 96, 135-143 (zitiert nach BfR, 2005a)
- NIELSEN, E.M., ENGBERG, J., MADSEN, M. (1997):
Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine.
FEMS Immunol. Med. Mic. 19, 47-56
- NOGVA, H.K., BERGH, A., HOLCK, A., RUDI, K. (2000):
Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*.
Appl. Environ. Microbiol. 66, 4029-4036
- NUIJTEN, P.J.M., VAN ASTEN, F.J.A.M., GAASTRA, W., VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1990):
Structural and functional analysis of two *Campylobacter* flagellin genes.
J. Biol. Chemistry 265, 17798-17804
- OLSVIK, O., POPOVIC, T., SKJERVE, E., CUDJOE, K.S., HORNES, E., UGELSTAD, J., UHLEN, M. (1994):
Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology.
Clin. Microbiol. Rev. 7, 43-54
- ON, S.L.W. (2001):
Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and intermediate concerns.
J. Appl. Microbiol. 90, 1-15
- ON, S.L.W und HOLMES, B. (1991):
Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species.
J. Clin. Microbiol. 29, 923-926
- ON, S.L.W. und JORDAN, P.J. (2003):
Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
J. Clin. Microbiol. 41, 330-336
- OOSTEROM, J., DE WILDE, G.J.A., DE BOER, E., DE BLAAUW, L.H., KARMAN, H. (1983):
Survival of *Campylobacter jejuni* during poultry processing and pig slaughtering.
J. Food Prot. 46, 702-706
- OPFER, C., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (2000):
Vergleich kultureller Verfahren zum Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch. In: 41. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene“, September 2002, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 551-556

- OPFER, C., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (2001):
Vergleich verschiedener PCR-Systeme für den Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch. Comparison of two different PCR assays for the detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. in poultry.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 114, 470-472
- ORR, K.E., LIGHTFOOT, N.F., SISSON, P.R., HARKIS, B.A., TWEDDLE, J.L., BOYD, P., CARROLL, A., JACKSON, C.J., WAREING, D.R.A., FREEMAN, R. (1995):
Direct milk excretion of *Campylobacter jejuni* in a dairy cow causing cases of human enteritis.
Epidemiol. Infect. 114, 15-24
- OYARZABAL, O.A., MACKLIN, K.S., BARBAREE, J.M., MILLER, R.S. (2005):
Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses.
Appl. Environ. Microbiol. 71, 3351-3354
- OYOFO, B.A., THORNTON, S.A., BURR, D.H., TRUST, T.J., PAVLOVSKIS, O.R., GUERRY, P. (1992):
Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction.
J. Clin. Microbiol. 30, 2613-2619
- OYOFO, B.A., ABD EL SALAM, S.M., CHURILLA, A.M., WASFY, M.O. (1997):
Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. from chicken using the polymerase chain reaction.
Zbl. Bakt. 285, 480-485
- PARK, S.F. (2000):
Environmental regulatory genes.
In: Nachamkin, I., Blaser, M.J. (eds), *Campylobacter*, 2nd edn., ASM Press, Washington D.C., 423-440
- PARK, S.F. (2002):
The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens.
Int. J. Food Microbiol. 74, 177-188
- PARK, C.E. und SANDERS, G.W. (1991):
A sensitive enrichment procedure for the isolation of *Campylobacter jejuni* from frozen foods. In: *Campylobacter V*, Proceeding 5th International Workshop on *Campylobacter* Infections, National Institut of Nutrition, Mexico, 102
- PARK, C.E. und SANDERS, G.W. (1992):
Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets.
Can. J. Microbiol. 38, 313-316 (zitiert nach FEDERIGHI et al., 1999)
- PARKHILL, J., WREN, B.W., MUNGALL, K., KETLEY, J.M., CHURCHER, C., BASHAM, D., CHILLINGWORTH, T., DAVIES, R.M., FELTWELL, T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KARLYSHEV, A.V., MOULE, S., PALLAN, M.J., PENN, C.W., QUAIL, M.A., RAJANDREAM, M.A., RUTHERFORD, K.M., VAN VLIET, A.H., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G. (2000):
The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences.
Nature 403, 665-668
- PATRICK, M.E., CHRISTIANSEN, L.E., WAINO, M., ETHELBERG, S., MADSEN, H., WEGENER, H.C. (2004):
Effects of climate on incidence of *Campylobacter* spp. in humans and prevalence in broiler flocks in Denmark.
Appl. Environ. Microbiol. 70, 7474-7480

- PATTERSON, M.F. (1995):
Sensitivity of *Campylobacter* spp. to irradiation in poultry meat.
Lett. Appl. Microbiol. 20, 338-340
- PEARSON, A.D. und HEALING, T.D. (1992):
The surveillance and control of campylobacter infection.
CDR Rev. 2, R133-R138
- PEBODY, R.G., RYAN, M.J., WALL, P.G. (1997):
Outbreaks of *Campylobacter* infection: rare events for a common pathogen.
CDR Rev. 7, R33-R37
- PENNER, J.L. und HENNESSY, J.N. (1980):
Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens.
J. Clin. Microbiol. 12, 732-737
- PERSSON, S. und OLSEN, K.E. (2005):
Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples.
J. Med. Microbiol. 54, 1043-1047
- PETERS, J., LIENAU, J.-A., NÄTHER, G., ALTER, T., MAC, K. N., SCHERER, K., SCHLICHTING, D., FRIEDMANN, M., KÄSBORER, A., BRAUNER, S., SCHLEUTER, G., HOHMANN, M., UPMANN, M., SCHELLER, R., KLENGEL, K., WILHELM, K., SEELMANN, M., HÖRMANNSDORFER, S., ELLERBROEK, L. (2006):
Resultate der ersten Phase des nationalen *Campylobacter*-Masthähnchenmonitorings 2004-2005.
Arch. Lebensmittelhyg. 57, 137-141
- PETERSEN, L., NIELSEN, E.M. und ON, S.L.W. (2001):
Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks.
Vet. Microbiol. 82, 141-154
- PETERSON, M.C. (1994):
Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults.
Scand. J. Rheumatol. 23, 167-170
- PETERZ, M. (1991):
Comparison of Preston agar and a blood-free selective medium for detection of *Campylobacter jejuni* in food.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74, 651-654
- PEZZOTTI, G., SERAFIN, A., LUZZI, I., MIONI, R., MILAN, M., PERIN, R. (2003):
Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in Northern Italy.
Int. J. Food Microbiol. 82, 281-287
- PHEBUS, R.K., DRAUGHON, F.A., MOUNT, J.R. (1991):
Survival of *Campylobacter jejuni* in modified atmosphere packaged turkey roll.
J. Food Prot. 54, 194-199
- PICKETT, C.L., PESCI, E.C., COTTLE, D.L., RUSSELL, G., ERDEM, A.N., ZEYTIM, H. (1996):
Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* genes.
Infect. Immun. 64, 2070-2078

- PIERSIMONI, C., BORNIGIA, S., CURZI, L., DE SIO, G. (1995):
Comparison of two selective media and an membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* spp. from diarrhoeal stools.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14, 539-542
- PIGRAU, C., BARTOLOME, R., ALMIRANTE, B., PLANES, A.-M., GAVALDA, J., PAHISSA, A. (1997):
Bacteraemia due to *Campylobacter* species: Clinical findings and antimicrobial susceptibility patterns.
Clin. Inf. Dis. 25, 1414-1420
- POPOVIC-UROIC, T., PATTON, C.M., NICHOLSON, M.A., KIEHLBAUCH, J.A. (1990):
Evaluation of the Indoxyl Acetate Hydrolysis Test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* species.
J. Clin. Microbiol. 28, 2335-2339
- PRESTON, M.A und PENNER, J.L. (1989):
Characterization of cross-reacting serotypes of *Campylobacter jejuni*.
Can. J. Microbiol. 35, 265-273
- PURDY, D., BUSWELL, C.M., HODGSON, A.E., MCALPINE, K., HENDERSON, I., LEACH, S.A. (2000):
Characterization of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*.
J. Med. Microbiol. 49, 473-479
- RAGIMBEAU, C., SALVAT, G., COLIN, P., ERMEL, G. (1998):
Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyr A* and *pflA* polymorphism to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species.
J. Appl. Microbiol. 85, 829-838
- RAUTELIN, H., JUSUFOVIC, J., HANNINEN, M.J. (1999):
Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 35, 9-12
- RAY, B. und JOHNSON, C. (1984):
Survival and growth of freeze-stressed *Campylobacter jejuni* cells in selective media.
J. Food Safety 6, 183-195
- RAYMOND, A. (2002):
Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Campylobacter* in Lebensmitteln. Diplomarbeit, FH Lippe, Lemgo
- REDMOND, E.C. und GRIFFITH, C.J. (2003):
Consumer food handling in the home: a review of food safety studies.
J. Food Protect. 66, 130-161
- REESER, R.J., MEDLER, R.T., BILLINGTON, S.J., JOST, B.H., JOENS, L.A. (2007):
Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions.
Appl. Environ. Microbiol. 73, 1908-1913
- REINHARD, R.G., MCADAMS, T.J., FLICK, G.J., WITTMAN, R.F., CROONENBERGHS, R.E., DIALLO, A.A. (1995):
Qualitative and Quantitative Analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in fresh Blue Crab (*Callinectes sapidus*) meat.
J. Aquat. Food Prod. Technol. 4, 31-36
- REINTHALER, F.F., FEIERL, G., STUNZNER, D., MARTH, E. (1998):
Diarrhea in returning Austrian tourists: epidemiology, etiology, and cost-analysis.
J. Travel. Med. 5, 65-72 (zitiert nach KIST, 2002)

- RENZ, V., CONTZEN, M., DREES, E., STEGMANN, T. (2007):
Untersuchungen zur Belastung von Entenbrüsten aus dem Einzelhandel mit *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Arcobacter* spp. vor und nach der Zubereitung von „Ente rosa“.
Arch. Lebensmittelhyg. 58, 170-174
- ROBERT KOCH-INSTITUT (1997):
Zwei Gruppenerkrankungen durch *Campylobacter jejuni* nach dem Verzehr von Rohmilch. Epidemiol. Bull. 50, 553-557
- ROBERT KOCH-INSTITUT (1999):
Ein Ausbruch von *Campylobacter enteritis* in Nordrhein-Westfalen.
Epidemiol. Bull. 43, 317-320
URL: http://www.rki.de/cln_011/nn_244006/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/1999/43_99,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/43_99
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2000A):
Campylobacter-Enteritis nach dem Genuss von Rohmilch.
Epidemiol. Bull. 26, 207-209
URL: http://www.rki.de/cln_011/nn_244006/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2000/26_00,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/26_00
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2000B):
Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *Campylobacter jejuni* nach dem Genuss von Rohmilch.
Epidemiol. Bull. 18, 143-145
URL: http://www.rki.de/cln_011/nn_244006/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2000/18_00,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/18_00
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2005):
Campylobacter-Infektionen. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte.
Epidemiol. Bull. 35, 259-261 (aktualisiert: Januar 2005)
URL: http://www.rki.de/cln_048/nn_466816/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Campylobacter.html
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2006A):
Campylobacter-jejuni Infektionen: Immer wieder Rohmilch als Vehikel!
Epidemiol. Bull. 16, 123-125
URL: http://www.rki.de/cln_048/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/16_06,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/16_06.pdf
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2006B):
Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: *Campylobacter*-Infektionen.
Epidemiol. Bull. 16, 351-352
URL: http://www.rki.de/cln_048/nn_196436/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2006/41_06,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/41_06.pdf
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2007):
Campylobacter-jejuni-Infektionen treten 2007 vermehrt auf.
Epi. Bull. 36, 331-334
- ROBERTS, T., SHAH, A., GRAHAM, J.G., MCQUEEN, I.N.F. (1987):
The Miller-Fisher Syndrome following *Campylobacter enteritis*: a report of two cases.
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 50, 1557-1558
- ROBINSON, D.A. (1981):
Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk.
Brit. Med. J. 282, 1584

- ROLLINS, D.M. und COLWELL, R.R. (1986):
Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural, aquatic environment.
Appl. Environ. Microbiol. 52, 531-538
- ROSEF, O. und KAPPERUD, G. (1983):
House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*.
Appl. Environ. Microbiol. 45, 381-383
- ROSEF, O., RETTEDAHL, G., LAGEIDE, L. (2001):
Thermophilic *Campylobacters* in surface water: a potential risk of campylobacteriosis.
Int. J. Environ. Health Res. 11, 321-327
- ROSENQUIST, H., BENGTSOON, A., BECK-HANSEN, T. (2007):
A collaborative study on a Nordic standard protocol for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* in food (NMKL 119, 3. Ed., 2007).
Int. J. Food Microbiol. 118, 201-213
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O.F. (1992):
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.
Int. J. Food Microbiol. 17, 37-45
- RYAN, M.J., WALL, P.G., GILBERT, R.J., GRIFFIN, M., ROWE, B. (1996):
Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering.
CDR Rev. 13, R179-R183
- SACHS, L. (2002):
Angewandte Statistik. 10. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- SACHSE, K. (2002):
Specificity and performance of diagnostic PCR assays. In: SACHSE, K., FREY, J. (eds), Methods Mol. Biol., vol. 216: PCR Technology for detection of foodborne pathogens, 3-29
- SAEED, A.M., HARRIS, N.V., DI GIACOMO, R.F. (1993):
The role of exposure to animals in the etiology of *Campylobacter jejuni* / *coli* enteritis.
Am. J. Epidemiol. 137, 108-114
- SAILS, A.D., BOLTON, F.J., FOX, A.J., WAREING, D.R.A., GREENWAY, D.L.A. (1998):
A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp..
Mol. Cell. Probe 12, 317-322
- SANDBERG, M., HOFSHAGEN, M., OSTENSVIK, O., SKJEVE, E., INNOCENT, G. (2005):
Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time.
J. Food Protect. 68, 1600-1605
- SCHERER, K. (2006):
Zur quantitativen Bestimmung von *Campylobacter* spp. auf der Oberfläche und im Muskel von Hähnchenfleisch aus dem Handel; Vergleich von verschiedenen Isolierungstechniken und Zählverfahren. Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin
- SCHERER, K., BARTELT, E., SOMMERFELD, C., HILDEBRANDT, G. (2006):
Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs.
Int. J. Food Microbiol. 108, 115-119
- SCHEU, P.M., BERGHOF, K., STAHL, U. (1998):
Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction.
Food Microbiol. 15, 13-31

- SCHINDLER, P.R.G., ELMER-ENGELHARD, D., HÖRMANNSDORFER, S. (2003):
Untersuchungen zum mikrobiologischen Status südbayrischer Badegewässer unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens thermophiler *Campylobacter*-Arten.
Bundesgesundheitsbl. 46, 483-487
- SCHÖNBERG-NORIO, D., TAKKINEN, J., HÄNNINEN, M.-L., KATILA, M.-L., KAUKORANTA, S.-S., MATTILA, L., RAUTELIN, H. (2004):
Swimming and *Campylobacter* infections.
Emerging. Infect. Dis. 10, 1474-1477
- SCHORR, D., SCHMID, H., RIEDER, H.L., BAUMGARTNER, A., VORKAUF, H., BURNENS, A. (1994):
Risk factors for *Campylobacter* enteritis in Switzerland.
Zbl. Hyg. 196, 327-337
- SCOTTER, S.L., HUMPHREY, T.J., HENLEY, A. (1993):
Methods for the detection of thermotolerant campylobacters in foods: an inter-laboratory study.
J. Appl. Bacteriol. 74, 155-163
- SIEMER, B.L., HARRINGTON, C.S., NIELSEN, E.M., BORCK, B., NIELSEN, N.L., ENGBERG, J., ON, S.L.W. (2004):
Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles.
J. Appl. Microbiol. 96, 795-802
- SKIRROW, M.B. und BENJAMIN, J. (1980):
Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*.
J. Clin. Pathol. 33, 1122
- SKIRROW, M.B., JONES, D.M., SUTCLIFFE, E., BENJAMIN, J. (1993):
Campylobacter bacteraemia in England and Wales, 1981-1991.
Epidemiol. Infect. 110, 567-573
- SMITH, J.L. (1995):
Arthritis, Guillain-Barré-Syndrome, and other sequelae of *Campylobacter jejuni* enteritis.
J. Food Prot. 58, 1153-1170
- SNELLING, W.J., MATSUDA, M., MOORE, J.E., DOOLEY, J.S.G. (2005):
Under the microscope – *Campylobacter jejuni*.
Lett. Appl. Microbiol. 41, 297-302
- SOLOMON, E.B. und HOOVER, D.G. (1999):
Campylobacter jejuni: A bacterial paradox.
J. Food Safety 19, 121-136
- SOLOMON, E.B. und HOOVER, D.G. (2004):
Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure.
Lett. Appl. Microbiol. 38, 505-509
- STANLEY, K., CUNNINGHAM, R., JONES, K. (1998):
Isolation of *Campylobacter jejuni* from ground water.
J. Appl. Microbiol. 85, 187-191
- STEELE, T.W. und MCDERMOTT, S.W. (1984):
The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces.
Pathol. 16, 263-265 (zitiert nach CORRY et al., 1995)

- STEINHAUSEROVA, I., CESKOVA, J., FOJTIKOVA, K., OBROVSKA, I. (2001):
Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods.
J. Appl. Microbiol. 90, 470-475
- STERN, N.J. und LINE, J.E. (1992):
Comparison of three methods for recovery of *Campylobacter* spp. from broiler carcasses.
J. Food Protect. 55, 663-666
- STRAUB, J.A., HERTEL, C., MÄDE, D., HAMMES, W.P. (1999):
Development and application of a heterologous internal standard for polymerase-chain-reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods.
Eur. Food Res. Technol. 209, 180-184
- STUDAHL, A. und ANDERSON, Y. (2000):
Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study.
Epidemiol. Infect. 125, 269-275
- SVEDHEM, A., KAIJSER, B., SJÖRGEN, E. (1981):
The occurrence of *Campylobacter jejuni* in fresh food and survival under different conditions.
J. Hyg. 87, 421-425
- SVOBODA, P., JÄGGI, N., ARNOLD, P., EBENSTREIT, C. (2002):
Untersuchungen zum Vorkommen von *Campylobacter* spp. in verschiedenen Lebensmitteln.
Mitt. Lebensm. Hyg. 93, 32-43
- TAKAHASHI, M., KOGA, M., YOKOYAMA, K., YUKI, N. (2005):
Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré and Fisher Syndromes in Japan.
J. Clin. Microbiol. 43, 335-339
- TALIBART, R., DENIS, M., CASTILLO, A., CAPPELIER, J.M., ERMEL, G. (2000):
Survival and recovery of viable but nonculturable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm.
Int. J. Food Microbiol. 55, 263-267
- TANGVATCHARIN, P., CHANTHACHUM, S., KOPAIBOON, P., INTTASUNGKHA, N., GRIFFITHS, M.W. (2005):
Comparison of methods for the isolation of thermotolerant *Campylobacter* from poultry.
J. Food Prot. 68, 616-620
- TEE, W. und MIJCH, A. (1998):
Campylobacter jejuni bacteremia in Human Immunodeficiency Virus (HIV)- infected and non-HIV-infected patients: Comparison of clinical features and review.
Clin. Inf. Dis. 26, 91-96
- TERZIEWA, S.I. und MCPETERS, G.A. (1991):
Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water.
Can. J. Microbiol. 37, 785-790
- THOMAS, C., GIBSON, H., HILL, D.J., MABEY, M. (1999):
Campylobacter epidemiology: an aquatic perspective.
J. Appl. Microbiol. Sympos. Suppl. 85, 168S-177S
- THURM, V. und DINGER, E. (1998):
Lebensmittelbedingte *Campylobacter*-Infektionen – Infektionsepidemiologische Aspekte der Ursachenermittlung, Überwachung und Prävention bei Ausbrüchen durch *Campylobacter jejuni*.
Infektionsepidemiologische Forschung. II/98, 6-10

- THURM, V., DINGER, E., LYYTIKÄINEN, O., PETERSEN, L., WIEBELITZ, A., LANGE, D., FISCHER, R.,
OPPERMANN, H., MÄDE, D. (1999):
Infektionsepidemiologie lebensmittelbedingter *Campylobacter*-Infektionen. - Untersuchungen eines
Ausbruchs in Sachsen-Anhalt mittels epidemiologischer, mikrobiologischer und molekularbiologi-
scher Methoden.
Bundesgesundheitsbl. 42, 206-211
- THURM, V., STARK, R., MÄDE, D., FANGHÄHNEL, S., BERGER, W., KNOBLOCH, H., LANGE, D. (2000):
Rohmilch als Ursache lebensmittelbedingter *Campylobacter*-Infektionen.
Bundesgesundheitsbl. 43, 777-780
- TILBURG, J. und DE BOER, E. (1994):
Methoden voor de isolatie van thermofiele campylobacters uit kipprodukten.
De Ware(n)-Chemicus 24, 91-104
- TOKUMARU, M., KONUMA, H., UMESAKO, M., KONNO, S., SHINAGAWA, K. (1990):
Rates of detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in meats in response to the sample-size and the
infection level of each species.
Int. J. Food Microbiol. 13, 41-46
- TOTTEN, P.A., PATTON, C.M., TENOVER, F.C., BARRETT, T.J., STAMM, W.E., STEIGERWALT, A.G., LIN, J.Y.,
HOLMES, K.K., BRENNER, D.J. (1987):
Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Wash-
ington.
J. Clin. Microbiol. 25, 1747-1752
- TRACHOO, N. und FRANK, J.F. (2002):
Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni* containing biofilms.
J Food Prot. 65, 1117-1121
- TRACHOO, N., FRANK, J.F., STERN, N.J. (2002):
Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses.
J. Food Prot. 65, 1110-1116
- UMUNNABUIKE, A.C. und IROKANULO, E.A. (1986):
Isolation of *Campylobacter* subsp. *jejuni* from Oriental and American cockroaches caught in kitch-
ens and poultry houses in Vom, Nigeria.
Int. J. Zoonoses 13, 180-186 (zitiert nach HEALING et al., 1992).
- UYTTENDAELE, M. und DEBEVERE, J. (1996):
Evaluation of Preston medium for detection of *Campylobacter jejuni* in vitro and in artificially and
naturally contaminated poultry products.
Food Microbiol. 13, 115-122
- UYTTENDAELE, M., DE TROY, P., DEBEVERE, J. (1999):
Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in
poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market.
J. Food Protect. 62, 735-740
- UZOIGWE, C. (2005):
Campylobacter infections of the pericardium and myocardium.
Clin. Microbiol. Infect. 11, 253-255
- VANDAMME, P. (2000):
Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*.
In: Nachamkin, I. und Blaser, M.J. (Hrsg.), *Campylobacter*, 2nd Edition, Am. Soc. Microbiol., ASM
Press, Washington DC, 3-26 (zitiert nach SNELLING et al., 2005)

- VANDAMME, P. und DELEY, J. (1991):
Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 451-455
- VAN DE GIESSEN, A.W., TILBURG, J.J., RITMEESTER, W.S., VAN DER, P.J. (1998):
Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures.
Epidemiol. Infect. 121, 57-66
- VAN DER KRUIJK, R.A., AFFOURTIT, M.J., ENDTZ, H.P., ARTS, W.F.M. (1994):
Campylobacter jejuni gastroenteritis and acute encephalopathy.
J. Infect. 28, 99-100
- VAN DOORN, L.-J., GIESENDORF, B.A.J., BAX, R., VAN DER ZEIJST, B.A.M., VANDAMME, P., QUINT, W.G.V. (1997):
Molecular discrimination between *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by polymerase chain reaction based on a novel putative GTPase gene.
Mol. Cell. Probes 11, 177-185
- WAAGE, A.S., VARDUND, T., LUND, V., KAPPERUD, G. (1999):
Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay.
Appl. Environ. Microbiol. 65, 1636-1643
- WAEGEL, A. und NACHAMKIN, I. (1996):
Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction.
Mol. Cell. Probes 10, 75-80
- WALLACE, J.S., STANLEY, K.N., CURRIE, J.E., DIGGLE, P.J., JONES, K. (1997):
Seasonality of thermophilic *Campylobacter* populations in chickens.
J. Appl. Microbiol. 82, 219-224
- WALLER, D.F. und OGATA, S.A. (2000):
Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods.
Appl. Environ. Microbiol. 66, 4115-4118
- WANG, H., FARBER, J.M., MALIK, N., SANDERS, G. (1999):
Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure.
Int. J. Food Microbiol. 52, 39-45
- WANG, G., CLARK, C.G., TAYLOR, T.M., PUCKNELL, C., BARTON, C., PRICE, L., WOODWARD, D.L., RODGERS, F.G. (2002):
Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subspec. *fetus*.
J. Clin. Microbiol. 40, 4744-4747
- WASSENAAR, T.M. (1997):
Toxin production by *Campylobacter* spp..
Clin. Microbiol. Rev. 10, 466-476
- WASSENAAR, T.M. und NEWELL, D.G. (2000):
Minireview: Genotyping of *Campylobacter* spp..
Appl. Environ. Microbiol. 66, 1-9

- WASSENAAR, T.M., BLEUMINK-PLUYM, N.M.C., VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1991):
Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion.
EMBO J. 10, 2055-2061
- WASSENAAR, T.M., GEILHAUSEN, B., NEWELL, D.G. (1998):
Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1816-1821
- WATERMAN, S.R. und SMALL, P.L. (1998):
Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2,5 when they are inoculated onto certain solid food surfaces.
Appl. Environ. Microbiol. 64, 3882-3886
- WEDDERKOPP, A., GRADEL, K.O., JORGENSEN, J.C., MADSEN, M. (2001):
Pre-harvest surveillance of *Campylobacter* and *Salmonella* in Danish broiler flocks: a two-year study.
Int. J. Food Microbiol. 68, 53-59
- WEGMÜLLER, B., LÜTHY, J., CANDRIAN, U. (1993):
Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products.
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2161-2165
- WERTH, B.-M. (2006):
Vergleichende Untersuchungen zu Schnellmethoden für den Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. in natürlich und artefiziell kontaminiertem Geflügelfleisch und -innereien sowie in Geflügelkot. Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin
- WHITEHOUSE, C.A., BALBO, P.B., PESCI, E.C., COTTLE, D.L., MIRABITO, P.M., PICKETT, C.L. (1998):
Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block.
Infect. Immun. 66, 1934-1940
- WHYTE, P., MC GILL, K., COWLEY, D., CARROLL, C., DOOLAN, I., O'LEARY, A., CASEY, E., COLLINS, J.D. (2003):
A comparison of two culture media for the recovery of thermophilic *Campylobacters* in broiler farm samples.
J. Microbiol. Methods 54, 367-371
- WHYTE, P., MC GILL, K., COWLEY, D., MADDEN, R.H., MORAN, L., SCATES, P., CARROLL, C., O'LEARY, A., FANNINGS, S., COLLINS, J.D., MCNAMARA, E., MOORE, J.E., CORMICAN, M. (2004):
Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland.
Int. J. Food Microbiol. 95, 111-118
- WIELAND, B., WITWER, M., REGULA, G., WASSENAAR, T.M., BURNENS, A.P., KELLER, J., STÄRK, K.D.C. (2006):
Phenon cluster analysis as a method to investigate epidemiological relatedness between sources of *Campylobacter jejuni*.
J. Appl. Microbiol. 100, 316-324
- WILLISON, H.J. und O'HANLON, G.M. (1999):
The immunopathogenesis of Miller-Fisher Syndrome.
J. Neuroimmunol. 100, 3-12
- WILSON, I.G. (1997):
Minireview: inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.
Appl. Environ. Microbiol. 63, 3741-3751

- WILSON, I.G. und MOORE, J.E. (1996):
Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish.
Epidemiol. Infect. 116, 147-153
- WINGSTRAND, A., NEIMANN, J., ENGBERG, J., MØLLER-NIELSEN, E., GERNER-SCHMIDT, P., WEGENER, H.C., MØLBAK, K. (2006):
Fresh chicken als main factor for campylobacteriosis in Denmark.
Emerg. Infect. Dis. 12, 280-285
<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no02/pdfs/05-0936.pdf>
- WINTERS, D.K., O'LEARY, A.E., SLAVIK, M.F. (1997):
Rapid PCR with nested primers for direct detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes.
Mol. Cell. Probes 11, 267-271
- WOLFS, T.F., DUIM, B., GEELEN, S. P., RIGHTER, A., THOMSON-CARTER, F., FLEER, A., WAGENAAR, J.A. (2001):
Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy.
Clin. Infect. Dis. 32, E97-E99
- WONG, T., DEVANE, M., HUDSON, J., SCHOLES, P., SAVILL, M., KLENA, K. (2004):
Validation of a PCR method for *Campylobacter* detection on poultry packs.
New Zealand Med. J. 113, 281-284
- WONGLUMSOM, W., VISHNUBHATLA, A., KIM, J.M., FUNG, D.Y.C. (2001):
Enrichment media for isolation of *Campylobacter jejuni* from inoculated ground beef and chicken skin under normal atmosphere.
J. Food Prot. 64, 630-634
- WOOD, R.C., MACDONALD, K.L., OSTERHOLM, M.T. (1992):
Campylobacter enteritis outbreaks associated with drinking raw milk during youth activities. A 10-year review of outbreaks in the United States.
JAMA 268, 3228-3230
- YANG, H., LI, Y., JOHNSON, M.G. (2001):
Survival and death of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling.
J. Food Prot. 64, 770-776
- ZANETTI, F., VAROLI, O., STAMPI, S., DE LUCA, G. (1996):
Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin.
Int. J. Food Microbiol. 33, 315-321
- ZHAO, P., ZHAO, T., DOYLE, M.P., RUBINO, J.R., MENG, J. (1998):
Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen.
J. Food Prot. 61, 960-963
- ZHAO, C., GE, B., DEVILLENA, J., SUDLER, R., YEH, E., ZHAO, S., WHITE, D.G., WAGNER, D., MENG, J. (2001):
Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D. C. Area.
Appl. Environ. Microbiol. 67, 5431-5436
- ZIMMERMANN, S., TOUTOUNIAN, K., KNÜVER, M.-T., ALTER, T. (2008):
Vergleich verschiedener Genotypisierungsmethoden zur Charakterisierung von *Campylobacter jejuni* – Darstellung an zwei praktischen Beispielen.
Arch. Lebensmittelhyg. 59, 9-15

9 Anhang

9.1 Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Brucella Bouillon

	g/Liter A. dest.
Tryptone	10,0
Peptamin	10,0
Dextrose	1,0
Yeast Extract	2,0
Sodium Chloride	5,0
Sodium bisulfite	0,1
pH-Wert bei 25 °C: $7,0 \pm 0,2$	

Columbia-Agar mit 5% defibriniertem Schafblut

	g/Liter A. dest.
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar-Agar	10,0
Defibriniertes Schafblut	50 ml
pH-Wert bei 25 °C: $7,3 \pm 0,2$	

Eisen-Dreizucker-Nährboden

	g/Liter A. dest.
Pepton	20,0
Fleischextrakt	3,0
Hefeextrakt	3,0
Natriumchlorid	5,0
Lactose	10,0
Saccharose	10,0
D(+)-Glucose	1,0
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5
Natriumthiosulfat	0,5
Phenolrot	0,024
Agar-Agar	12,0
pH-Wert bei 25 °C: $7,4 \pm 0,2$	

Glutamat Stärke Phenolrot-Agar nach Kielwein (GSP)

	g/Liter A. dest.
Natrium-L(+)-glutamat	10,0
Stärke, löslich	20,0
Kaliumhydrogenphosphat	2,0
Magnesiumsulfat	0,5
Phenolrot	0,36
Agar-Agar	12,0
Penicillin-G, 100000 I.E.	
pH-Wert bei 25 °C: $7,2 \pm 0,2$	

Karmali-Selektivnährboden

	g/Liter A. dest.
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Aktivkohle	4,0
Hämin	0,032
Natriumpyruvat	0,1
Cefoperazon	0,032
Vancomycin	0,02
Amphotericin B	0,01
pH-Wert bei 25 °C: 7,4 ± 0,2	

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Selektivnährboden nach Mossel (VD)

	g/Liter A. dest.
Pepton aus Fleisch	7,0
Hefeextrakt	3,0
Natriumchlorid	5,0
D(+)-Glucose	10,0
Gallesalzmischung	1,5
Neutralrot	0,03
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,0
pH-Wert bei 25 °C: 7,3 ± 0,2	

mCCDA-Selektivnährboden

	g/Liter A. dest.
Fleischextract „Lab-Lemco“	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
Bakteriologische Kohle	4,0
Casein-Hydrolysat	3,0
Natriumdesoxycholat	1,0
Eisen(II)-sulfat	0,25
Natriumpyruvat	0,25
Cefoperazon	0,032
Amphotericin B	0,1
pH-Wert bei 25 °C: 7,4 ± 0,2	

<u>Mueller-Hinton-Agar mit 5% defibriniertem Schafblut</u>	g/Liter A. dest.
Fleischinfus	2,0
Caseinhydrolysat	17,5
Stärke	1,5
Agar-Agar	17,0
Defibriniertes Schafblut	50 ml
pH-Wert bei 25 °C: 7,0 ± 0,2	

<u>Nährbouillon Nr. 2</u>	g/Liter A. dest.
Fleischextract „Lab-Lemco“	1,0
Hefeextrakt	2,0
Pepton	5,0
Natriumchlorid	5,0
pH-Wert bei 25 °C: 7,4± 0,2	

Park und Sanders-Selektivanreicherungsmedium

	g/Liter A. dest.
Fleischextract „Lab-Lemco“	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
Hefeextrakt	2,25
Glucose	1,125
Natriumhydrogensulfit	0,113
Natriumpyruvat	0,281
Natriummetabisulfit	0,281
Eisen(II)-sulfat	0,281
Pferdeblut, lysiert	50 ml
Vancomycin	0,011
Trimethoprim	0,011
pH-Wert bei 25 °C: 7,0 ± 0,2	

Antibiotikallösung B

	g/Liter A. dest.
Cefoperazon	0,036
Cycloheximid	0,113
A.D./Aceton, 50/50 (v/v)	5 ml

Die Park und Sanders-Selektivanreicherungsbouillon wurde am Tag vor der Verwendung durch den Zusatz von Supplementen, Antibiotikallösung A und von sterilem, lysiertem Pferdeblut zum Basismedium vervollständigt. Bis zur Verwendung wurde das vervollständigte Flüssigmedium im Dunkeln bei ca. + 4 °C aufbewahrt. Die Selektivanreicherungsbouillon nach Park und Sanders wird mehrstufig supplementiert und inkubiert. Die Antibiotikallösung B wird der mit Probenmaterial beimpften Selektivanreicherungsbouillon nach 4-stündiger mikroaerober Inkubation bei 32 °C bis zu einer Endkonzentration von 5 ‰ (Volumen/Volumen) zugegeben. Im Anschluss daran wird die Anreicherungslösung 2 h bei 37 °C mikroaerob und abschließend bei 42 °C mikroaerob bebrütet.

<u>Peptonwasser</u>	g/Liter A. dest.
Pepton aus Casein	1,0
Tween®80	1,0
Agar-Agar	0,4
pH-Wert bei 25 °C: 7,0 ± 0,2	

<u>Plate-Count-Agar (PC)</u>	g/Liter A. dest.
Pepton aus Casein	15,0
Hefeextrakt	2,5
D(+)-Glucose	1,0
Agar-Agar	14,0
pH-Wert bei 25 °C: 7,0 ± 0,2	

Preston-Selektivanreicherungsmedium

	g/Liter A. dest.
Fleischextract „Lab-Lemco“	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
Polymyxin B	5625 IE
Rifampicin	0,011
Trimethoprim	0,011
Cycloheximid	0,113
Natriumpyruvat	0,281
Natriummetabisulfit	0,281
Eisen(II)-sulfat	0,281
Pferdeblut, lysiert	50 ml
pH-Wert bei 25 °C: 7,5± 0,2	

Die Preston-Selektivanreicherungsbouillon wurde am Tag vor der Verwendung durch den Zusatz von Supplementen und von sterilem, lysierten Pferdeblut zum Basismedium vervollständigt. Bis zur Verwendung wurde das vervollständigte Flüssigmedium im Dunkeln bei ca. + 4 °C aufbewahrt.

<u>Standard I-Nährboden (Merck)</u>	g/Liter A. dest.
Pepton	15,0
Hefeextrakt	3,0
Natriumchlorid	6,0
D(+)-Glucose	1,0
Agar-Agar	12,0
pH-Wert bei 25 °C: 7,5 ± 0,2	

Zitrat-Azid-Tween-Karbonat-Selektivnährboden (ZATK)

	g/Liter A. dest.
Pepton aus Casein	15,0
Hefeextrakt	5,0
Kaliumdihydrogenphosphat	5,0
Natriumcitrat	15,0
Tween®80	1,0
Agar-Agar	15,0
Natriumcarbonat	2,0
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	0,1
Natriumazid	0,4
pH-Wert bei 25 °C: 7,0 ± 0,2	

9.2 Tabellen

Tab. 22: Keimzahlbestimmung bei natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel, 1998-1999 (Studie 1)

Nr.	Produktbezeichnung	Angebotszustand	Tierart	Keimzahl bei 30°C [KbE/ml]	Pseudomonaden [KbE/ml]	Enterobakterien [KbE/ml]	Enterokokken [KbE/ml]	Campylobacter [KbE/ml]
1	Putenleber	TK	Pute	8,2E+04	2,7E+03	4,0E+03	4,0E+02	<1,0E+01
2	Putenleber	TK	Pute	6,5E+05	4,5E+04	8,0E+03	6,0E+02	<1,0E+01
3	Hähnchenbrustfilet	TK	Huhn	6,9E+04	2,4E+04	1,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
4	Hähnchenmägen	TK	Huhn	1,8E+05	8,2E+04	1,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
5	Hähnchenleber	TK	Huhn	6,2E+05	6,2E+03	7,8E+03	4,2E+03	<1,0E+01
6	Hühnerklein	TK	Huhn	7,6E+04	5,1E+04	8,0E+02	4,0E+02	3,0E+01
7	Hähnchenmägen	TK	Huhn	8,2E+04	6,4E+03	8,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
8	Chicken Wings m. 8% Flüssigwürze	TK	Huhn	3,8E+05	2,2E+04	4,2E+03	2,0E+02	<1,0E+01
9	Truthahngrillsteaks, mariniert	TK	Pute	6,5E+04	8,0E+03	6,0E+02	4,0E+02	<1,0E+01
10	Putenleber	frisch	Pute	3,4E+05	2,0E+04	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
11	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	2,7E+07	3,6E+07	4,0E+05	2,0E+03	<1,0E+01
12	Entenkeulen	TK	Ente	2,4E+04	4,0E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
13	Hähnchenfilets	TK	Huhn	4,4E+05	5,6E+04	2,0E+03	4,0E+02	<1,0E+01
14	Truthahnschnitzel, gewürzt	TK	Pute	2,0E+05	1,5E+05	2,0E+04	2,0E+03	<1,0E+01

15	Flugente, geviertelt	TK	Ente	2,0E+05	2,0E+02	1,0E+02	4,0E+02	<1,0E+01
16	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	4,0E+04	4,0E+02	1,0E+02	2,0E+03	<1,0E+01
17	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	6,4E+07	6,6E+07	1,0E+06	6,0E+03	<1,0E+01
18	Putenleber	TK	Pute	1,2E+06	8,0E+04	5,0E+02	2,0E+03	<1,0E+01
19	Entenkeulen	TK	Ente	3,0E+06	1,3E+06	8,0E+03	5,0E+03	<1,0E+01
20	Putenoberschenkel	frisch	Pute	8,0E+06	3,0E+05	8,0E+04	1,0E+02	<1,0E+01
21	Putenleber	frisch	Pute	1,8E+06	6,0E+05	2,0E+03	1,0E+02	3,0E+01
22	Putenfiletgulasch	frisch	Pute	4,0E+06	8,0E+06	8,0E+04	1,0E+02	<1,0E+01
23	Barbecue-Mix	frisch	Pute + Huhn	1,5E+07	9,0E+06	4,0E+04	1,0E+02	<1,0E+01
24	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	7,3E+07	7,7E+07	1,0E+06	2,0E+02	<1,0E+01
25	Hähnchenleber	frisch	Huhn	6,0E+05	3,0E+04	6,0E+04	2,0E+02	1,0E+01
26	Hähnchenbrustfilet	frisch	Huhn	1,1E+07	3,0E+06	6,0E+05	1,6E+04	<1,0E+01
27	Putenbrustfilet	frisch	Pute	4,0E+05	2,0E+05	4,0E+04	1,0E+02	<1,0E+01
28	Junge Wildente, mit Hals ohne Innereien	TK	Ente	1,0E+06	2,0E+04	1,0E+02	4,0E+03	<1,0E+01
29	Putenunterschenkel	TK	Pute	2,0E+04	2,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
30	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	2,9E+06	2,2E+06	1,6E+04	1,0E+02	<1,0E+01
31	Putenschnitzel	frisch	Pute	7,6E+06	6,9E+06	1,3E+05	1,0E+02	<1,0E+01
32	Putenleber	TK	Pute	4,4E+06	2,4E+05	8,4E+04	2,0E+05	7,0E+01
33	Brust von jung. poln. Hafermastgans	TK	Gans	2,7E+04	1,1E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
34	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	2,7E+06	8,0E+04	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
35	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	2,5E+05	1,0E+05	6,0E+02	2,0E+02	1,0E+01
36	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	1,6E+06	6,0E+05	8,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
37	Hähnchenmägen	TK	Huhn	2,0E+03	6,0E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
38	Hähnchenbrust	TK	Huhn	2,4E+04	2,0E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
39	Poln. Gänseklein	TK	Gans	5,6E+04	7,8E+03	2,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
40	Jungpute, mit Hals und Innereien	TK	Pute	4,4E+03	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
41	Hähnchenleber	TK	Huhn	1,2E+05	1,0E+02	4,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
42	Gänseklein	TK	Gans	7,5E+04	2,7E+04	1,1E+03	2,0E+02	<1,0E+01

43	Putenleber	TK	Pute	4,9E+04	2,7E+03	4,5E+03	3,6E+03	4,0E+01
44	Truthahngrillsteaks m. 8% Flüssigwürze	TK	Pute	1,1E+05	2,0E+04	9,1E+02	1,0E+02	<1,0E+01
45	Honig-Flugentenkeulen	TK	Ente	9,6E+04	6,7E+04	2,9E+03	1,0E+02	<1,0E+01
46	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	2,0E+05	4,4E+04	1,2E+04	2,0E+02	<1,0E+01
47	Putenbratwurst im Sait- ling	frisch	Pute	9,8E+04	4,5E+03	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
48	Putenkeulenrollbraten m. 8% Flüssigwürze	TK	Pute	7,5E+04	7,1E+04	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
49	Hähnchenbrustfilet	TK	Huhn	8,5E+04	3,8E+04	8,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
50	Chicken Chips, pan.	TK	Huhn	1,3E+04	9,1E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
51	Truthahngrillsteaks m. 8% Flüssigwürze	TK	Pute	5,1E+05	8,0E+03	1,5E+03	4,0E+02	<1,0E+01
52	Wachteln	TK	Wach- tel	5,8E+03	1,0E+02	2,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
53	Putenunterschenkel	TK	Pute	2,1E+05	6,0E+02	1,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
54	Putenleber	TK	Pute	3,1E+05	5,1E+03	2,0E+03	4,0E+02	<1,0E+01
55	Gänsekeule von jung. Hafermastgans	TK	Gans	6,0E+02	2,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
56	Hähnchen	TK	Huhn	1,4E+05	1,0E+02	1,0E+02	6,0E+02	<1,0E+01
57	Hähnchenflügel	TK	Huhn	5,8E+04	2,4E+03	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
58	Hähnchenleber	TK	Huhn	1,4E+06	1,0E+03	1,1E+04	1,8E+05	2,0E+01
59	Putenleber	TK	Pute	5,3E+05	3,6E+03	5,0E+04	1,3E+03	<1,0E+01
60	Hähnchen-Nuggets, pan. mit 8% Flüssigwürze	TK	Huhn	1,3E+06	2,5E+03	1,2E+03	6,0E+02	<1,0E+01
61	Putenschnitzel, pan. mit 8% Flüssigwürze	TK	Pute	2,9E+05	4,0E+03	4,0E+02	3,6E+03	<1,0E+01
62	Putenschnitzel m. 8% Flüssigw.	TK	Pute	1,3E+05	1,2E+05	2,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
63	Putenbrustfilettasche gef. m. Putenschinken	TK	Pute	6,0E+04	3,5E+03	6,0E+02	4,4E+04	<1,0E+01
64	Hähnchenmägen	TK	Huhn	7,1E+04	9,1E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
65	Wachteln	TK	Wach- tel	2,9E+04	3,8E+03	1,6E+03	2,0E+02	1,0E+01
66	Hendlprinzeßfilet, pan.	TK	Huhn	2,2E+03	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
67	Putenschnitzel	TK	Pute	5,3E+03	1,0E+03	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01

68	Hähnchenschnitzel	TK	Huhn	2,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
69	Putenkeulenrollbraten m. 8% Flüssigwürze	TK	Pute	2,7E+04	2,2E+04	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
70	Marinierte Putenfilets m. 8% Flüssigwürze	TK	Pute	5,5E+05	1,2E+05	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
71	Hähnchenbrustfilet m. 8% Flüssigwürze	TK	Huhn	2,9E+03	8,0E+02	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
72	Hähnchenleber	TK	Huhn	1,0E+05	2,9E+03	3,5E+03	1,0E+02	3,0E+01
73	Hähnchenmägen	TK	Huhn	1,1E+05	2,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+01
74	Wachteln mit Hals o. Innereien	frisch	Wach- tel	4,2E+06	1,0E+06	5,3E+03	4,2E+04	<1,0E+01
75	Hähnchenflügel	frisch	Huhn	2,9E+05	1,2E+06	8,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
76	Hähnchenbrustfilet	frisch	Huhn	5,1E+03	4,0E+03	1,2E+03	1,0E+02	<1,0E+01
77	Hähnchenunterschenkel	frisch	Huhn	2,0E+05	3,6E+04	6,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
78	Putenoberschenkel	frisch	Pute	1,4E+07	2,5E+06	5,8E+05	5,3E+03	2,0E+01
79	Putenbrustfiletgulasch	frisch	Pute	4,2E+06	1,5E+07	3,2E+03	1,0E+02	<1,0E+01
80	Putenleber	frisch	Pute	2,4E+03	2,4E+03	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
81	Straußensteak	frisch	Strauß	5,6E+06	1,1E+05	8,0E+04	6,7E+03	<1,0E+01
82	Fr. Barb. Entenbrust mit Haut	frisch	Ente	2,2E+06	5,1E+03	4,4E+05	7,5E+03	<1,0E+01
83	Putenbrustfilet	frisch	Pute	3,6E+06	7,5E+05	1,6E+06	6,0E+05	<1,0E+01
84	Ditmarscher Barb.-Enten- Klein	frisch	Ente	2,0E+07	2,2E+07	1,2E+05	2,0E+02	<1,0E+01
85	Putenbrustfiletspieße mit Paprika, Speck	frisch	Pute	7,6E+07	7,6E+07	6,4E+05	2,0E+02	<1,0E+01
86	Putenherzen	frisch	Pute	1,6E+05	1,4E+05	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
87	Putenleber	frisch	Pute	7,1E+05	8,7E+05	8,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
88	Putenmägen	frisch	Pute	3,2E+07	2,4E+07	2,6E+05	2,0E+02	<1,0E+01
89	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	1,3E+06	1,5E+05	2,0E+04	1,0E+02	<1,0E+01
90	Putenbratwurst im Saitling	frisch	Pute	1,2E+06	9,3E+05	3,3E+04	3,6E+03	<1,0E+01
91	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	1,1E+05	1,0E+04	2,0E+03	1,0E+02	1,0E+01
92	Hähnchenleber	frisch	Huhn	9,1E+06	1,1E+07	1,6E+06	6,2E+03	<1,0E+01
93	Putenschnitzel	frisch	Pute	7,6E+04	4,5E+04	1,0E+04	1,0E+03	<1,0E+01
94	Hähnchenbrustfilet	frisch	Huhn	3,4E+04	7,3E+03	1,6E+04	2,0E+02	<1,0E+01

95	Truthahnschnitzel	frisch	Pute	3,3E+06	3,1E+06	9,5E+03	1,0E+02	<1,0E+01
96	Hähnchenleber	frisch	Huhn	1,3E+05	2,2E+03	1,6E+04	2,0E+02	<1,0E+01
97	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	1,6E+05	6,5E+03	2,4E+03	1,0E+02	<1,0E+01
98	Hähnchenmägen	TK	Huhn	4,4E+04	4,2E+03	2,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
99	Putenleber	TK	Pute	3,8E+04	1,2E+04	1,5E+03	4,0E+02	<1,0E+01
100	Hähnchenmägen	TK	Huhn	6,7E+04	3,6E+04	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
101	Hähnchenmägen	TK	Huhn	7,8E+03	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
102	Hähnchenleber	TK	Huhn	1,3E+05	2,4E+03	2,4E+03	1,0E+02	<1,0E+01
103	Hähnchenleber	TK	Huhn	2,2E+06	2,7E+03	4,0E+02	1,3E+03	3,0E+01
104	Hähnchenmägen	TK	Huhn	7,3E+04	1,0E+04	2,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
105	Hähnchenmägen	TK	Huhn	4,4E+05	2,0E+03	2,0E+02	6,0E+02	<1,0E+01
106	Putenbrustfilet	frisch	Pute	3,8E+07	2,3E+07	2,8E+06	2,2E+03	<1,0E+01
107	Putenoberkeulenrollbraten	frisch	Pute	2,3E+08	1,9E+08	4,4E+07	3,1E+05	<1,0E+01
108	Füllhorn Öko-Puten-Oberkeule	frisch	Pute	3,6E+05	2,7E+03	3,3E+03	1,0E+02	<1,0E+01
109	Füllhorn Öko-Puten-Schnitzel	frisch	Pute	1,2E+05	4,0E+02	1,3E+03	1,0E+02	<1,0E+01
110	Hähnchenherzen	TK	Huhn	8,0E+05	1,0E+06	3,1E+03	6,0E+02	<1,0E+01
111	Hähnchenleber	TK	Huhn	1,0E+06	6,7E+04	5,6E+04	2,7E+04	<1,0E+01
112	Hähnchenmägen	TK	Huhn	2,9E+05	2,5E+04	1,1E+03	4,0E+03	<1,0E+01
113	Hähnchenschenkel	TK	Huhn	8,0E+04	9,1E+03	3,0E+03	6,0E+03	<1,0E+01
114	Hähnchenleber	frisch	Huhn	4,9E+04	2,2E+04	1,4E+04	4,0E+02	<1,0E+01
115	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	8,7E+04	1,6E+04	1,3E+03	1,0E+02	<1,0E+01
116	Hähnchenbrustfilet	frisch	Huhn	4,2E+04	9,1E+03	1,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
117	Putenbrustfilet	frisch	Pute	8,2E+05	4,7E+04	1,8E+03	1,0E+02	<1,0E+01
118	Hähnchenherzen	TK	Huhn	4,7E+04	1,0E+04	2,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
119	Hähnchenherzen	TK	Huhn	1,3E+04	1,5E+04	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
120	Putenbrustfilets	TK	Pute	2,4E+05	4,2E+04	1,4E+03	8,0E+02	<1,0E+01
121	Hähnchenfilets	TK	Huhn	8,5E+06	3,6E+06	4,4E+03	6,0E+02	<1,0E+01
122	Putenleber	TK	Pute	2,7E+05	6,2E+04	6,2E+03	1,1E+03	<1,0E+01
123	Füllhorn Öko-Putenoberkeule	frisch	Pute	1,8E+05	1,8E+04	2,5E+03	2,0E+02	<1,0E+01

124	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	8,2E+04	4,0E+04	7,5E+03	3,3E+03	5,0E+01
125	Putenleber	frisch	Pute	1,0E+05	1,6E+03	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+01
126	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	6,2E+03	1,6E+04	1,0E+02	2,0E+03	<1,0E+01
127	Hähnchenleber	frisch	Huhn	2,9E+05	4,0E+03	2,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
128	Putenleber	frisch	Pute	3,6E+05	2,0E+05	2,4E+03	1,0E+02	<1,0E+01
129	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	7,1E+05	3,6E+05	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
130	Putenleber	TK	Pute	8,5E+05	2,2E+04	5,8E+05	1,0E+02	<1,0E+01
131	Hühnerklein	TK	Huhn	9,1E+04	2,4E+05	9,1E+02	1,1E+03	<1,0E+01
132	Hähnchenschenkel	TK	Huhn	4,9E+04	5,5E+04	1,0E+02	4,0E+02	<1,0E+01
133	Hähnchenleber	TK	Huhn	2,2E+06	2,9E+04	3,3E+03	2,2E+03	3,0E+01
134	Füllhorn Öko- Putenoberkeule	frisch	Pute	3,5E+05	1,8E+04	3,8E+04	2,0E+02	<1,0E+01
135	Hähnchenmägen	TK	Huhn	3,3E+03	2,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
136	Hähnchenleber	TK	Huhn	5,3E+05	3,3E+04	6,0E+04	3,5E+03	4,0E+01
137	Hähnchenschenkel	TK	Huhn	7,3E+04	3,3E+03	4,0E+02	1,1E+03	<1,0E+01
138	Putenschnitzel	frisch	Pute	2,6E+04	4,4E+03	4,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
139	Putenherzen	frisch	Pute	6,4E+04	4,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
140	Putenherzen	frisch	Pute	8,9E+05	1,3E+06	4,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
141	Putenmägen	frisch	Pute	3,4E+06	1,0E+06	1,1E+05	1,0E+02	<1,0E+01
142	Putenleber	frisch	Pute	2,4E+05	5,5E+04	4,0E+03	1,0E+02	<1,0E+01
143	Hähnchenmägen	TK	Huhn	3,0E+05	9,1E+04	2,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
144	Hähnchenschenkel	TK	Huhn	1,6E+04	1,0E+03	6,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
145	Hähnchenschenkel	TK	Huhn	1,6E+04	6,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
146	Putenbrust	TK	Pute	3,6E+04	3,4E+03	8,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
147	Fasan	TK	Fasan	4,4E+03	1,0E+02	1,0E+02	1,0E+02	<1,0E+01
148	Barbarieentenschenkel	TK	Ente	7,6E+07	2,6E+07	7,3E+04	1,0E+02	<1,0E+01
149	Hühnerklein	TK	Huhn	9,8E+04	2,4E+04	2,2E+03	2,0E+02	<1,0E+01
150	Hähnchenherzen	TK	Huhn	8,5E+04	3,8E+04	1,0E+02	1,0E+02	2,0E+01
151	Hähnchenmägen	TK	Huhn	3,5E+05	2,9E+03	2,0E+02	2,0E+02	<1,0E+01
152	Hähnchenherzen	TK	Huhn	1,1E+05	8,9E+04	1,2E+03	2,0E+02	<1,0E+01
153	Hähnchenmägen	TK	Huhn	2,9E+06	1,1E+06	6,2E+04	4,0E+03	<1,0E+01

Tab. 23: Ergebnisse des Methodenvergleichs bei natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel im Jahr 2000 (Studie 2)

Nr.	Verkehrs- bezeichnung	Angebots- zustand	Tierart	Referenzmethode gemäß ISO 10272:1995 (E) POS = positiv NEG = negativ	Alternativverfahren seminested PCR POS = positiv NEG = negativ	Alternativverfahren pg50/pg3-PCR- System POS = positiv NEG = negativ
1	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
2	Putenleber	TK	Pute	POS	POS	POS
3	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
4	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
5	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
6	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
7	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
8	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
9	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
10	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
11	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
12	Hähnchenmägen	TK	Huhn	POS	POS	POS
13	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	POS
14	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
15	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	NEG
16	Hähnchenleber	frisch	Huhn	POS	POS	POS
17	Putenleber	frisch	Pute	POS	POS	POS
18	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
19	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
20	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
21	Hähnchenmägen	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
22	Putenleber	TK	Pute	POS	POS	POS
23	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
24	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
25	Hähnchenmägen	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG

26	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
27	Hähnchenunter- schenkel	frisch	Huhn	POS	POS	POS
28	Putenleber	frisch	Pute	POS	POS	POS
29	Putenoberschenkel	frisch	Pute	POS	POS	POS
30	Hühnerklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
31	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	POS
32	Hühnerklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
33	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
34	Putenunterschenkel	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
35	Gänsebrustfilet	TK	Gans	NEG	NEG	NEG
36	Hähnchenflügel	frisch	Huhn	POS	POS	POS
37	Hähnchenleber	frisch	Huhn	POS	POS	POS
38	Putenleber	TK	Pute	POS	POS	POS
39	Wachteln, ausgenommen, gerupft	TK	Wachtel	POS	POS	POS
40	Wachteln, ausgenommen, gerupft	TK	Wachtel	NEG	NEG	NEG
41	Hühnerklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
42	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
43	Hähnchenmägen	TK	Huhn	NEG	NEG	POS
44	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	POS
45	Putenbrust	frisch	Pute	POS	POS	POS
46	Hähnchenleber	frisch	Huhn	POS	POS	POS
47	Hähnchenleber	frisch	Huhn	NEG	NEG	NEG
48	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	POS	POS	POS
49	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
50	Hähnchenklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
51	Hähnchenleber	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
52	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	NEG
53	Putenleber	TK	Pute	POS	POS	POS

54	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	POS	POS	POS
55	Hähnchenleber	frisch	Huhn	NEG	NEG	NEG
56	Putenherzen	frisch	Pute	POS	POS	POS
57	Putenleber	frisch	Pute	POS	POS	POS
58	Putenschnitzel	frisch	Pute	POS	POS	POS
59	Putenoberschenkel	frisch	Pute	NEG	NEG	NEG
60	Hühnerklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
61	Hühnerklein	TK	Huhn	POS	POS	POS
62	Hähnchenmägen	TK	Huhn	POS	POS	POS
63	Hähnchenleber	frisch	Huhn	NEG	NEG	NEG
64	Hähnchenmägen	frisch	Huhn	NEG	NEG	NEG
65	Hähnchenherzen	frisch	Huhn	NEG	NEG	NEG
66	Hähnchenleber	frisch	Huhn	NEG	NEG	POS
67	Putenschnitzel	frisch	Pute	NEG	NEG	POS
68	Putenschnitzel	frisch	Pute	NEG	NEG	NEG
69	Putenleber	frisch	Pute	POS	POS	POS
70	Putenmägen	frisch	Pute	POS	POS	POS
71	Putenherzen	frisch	Pute	NEG	NEG	NEG
72	Putenleber	TK	Pute	POS	POS	POS
73	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
74	Hähnchenmägen	TK	Huhn	NEG	NEG	NEG
75	Hähnchenherzen	TK	Huhn	NEG	NEG	POS
76	Putenleber	TK	Pute	NEG	NEG	POS
77	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
78	Hähnchenleber	TK	Huhn	POS	POS	POS
79	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	POS
80	Hähnchenherzen	TK	Huhn	POS	POS	POS

9.3 Verzeichnis der Tabellen

9.3.1 Verzeichnis der Tabellen im Text

Tab. 1	Differenzierungsmerkmale ausgewählter Spezies der Gattung <i>Campylobacter</i> (nach VANDAMME, 2000)	3
Tab. 2	Wachstumsanforderungen und –grenzen für <i>C. jejuni</i> (ICMSF, 1996)	4
Tab. 3	Hitzeresistenz von <i>Campylobacter jejuni</i> in Geflügelfleisch	5
Tab. 4	Relative Häufigkeit klinischer Leitsymptome im Zusammenhang mit Häufungen (in %)	9
Tab. 5	<i>Campylobacter</i> -Nachweisraten in frischem Fleisch auf Einzelhandelsebene im Zeitraum von 2002 bis 2005 (modifiziert nach EFSA, 2006)	18
Tab. 6	Keimzahlen und Prävalenzen von <i>Campylobacter</i> in Hähnchenfleisch	27
Tab. 7	Übersicht über die zur Untersuchung gelangten Produkte	37
Tab. 8	Differenzierungsmerkmale zur Speziesdifferenzierung	42
Tab. 9	Verwendete Nährböden und Inkubationsbedingungen	43
Tab. 10	Ausgewählte Kennzeichen der beiden PCR-Systeme	50
Tab. 11	Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix des CF03/CF04-PCR-Systems	51
Tab. 12	Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix des pg50/pg3-PCR-Systems	51
Tab. 13	<i>Campylobacter</i> -Nachweis (Gesamtisolierungsrate), gegliedert nach Produktart und Angebotszustand	52
Tab. 14	Auswerteschema für den Vierfeldertest (SACHS, 2002)	54
Tab. 15	Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon mit bzw. ohne Blut	54
Tab. 16	Ergebnisse der quantitativen <i>Campylobacter</i> -Bestimmung der Geflügelfleischprodukte	58
Tab. 17	Ergebnisse der semiquantitativen <i>Campylobacter</i> -Bestimmung der Geflügelfleischprodukte nach Anreicherung in Park und Sanders-Anreicherungsbouillon (n = 153, davon 76 <i>Campylobacter</i> -positiv in 25 ml)	58
Tab. 18	Koloniezahlen (log KbE/ml Spülflüssigkeit) von frischen Geflügelfleischprodukten: Geflügelfleisch (n = 28), Geflügelfleischzubereitungen (n = 3) und Geflügelinnereien (n = 33) unter Angabe von Median (x_{50}), Minimum (x_{\min}), Maximum (x_{\max}), 25 %-Quartil (x_{25}) und 75 %-Quartil (x_{75})	59
Tab. 19	Koloniezahlen (log KbE/ml Spülflüssigkeit) von tiefgekühlten Geflügelfleischprodukten: Geflügelfleisch (n = 33), Geflügelfleischzubereitungen (n = 17) und Geflügelinnereien (n = 39) unter Angabe von Median (x_{50}), Minimum (x_{\min}), Maximum (x_{\max}), 25 %-Quartil (x_{25}) und 75 %-Quartil (x_{75})	59

Tab. 20	Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E) mit der seminested PCR nach WEGMÜLLER et al. (1993)	60
Tab. 21	Vierfeldertest als Auswerteschema für den Methodenvergleich Preston-Bouillon gem. ISO 10272:1995 (E) mit dem pg50/pg3-PCR-System nach OYOFO et al. (1992)	60

9.3.2 Verzeichnis der Tabellen im Anhang

Tab. 22	Keimzahlbestimmung bei natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel, 1998-1999 (Studie 1)	108
Tab. 23	Ergebnisse des Methodenvergleichs bei natürlich kontaminiertem Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel im Jahr 2000 (Studie 2)	114

9.4 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>C. jejuni</i> -Zellen auf einem 0,65 µm-Membranfilter (entnommen aus ALTEKRUSE et al., 1999)	2
Abb. 2	Epidemiologie der humanen Campylobacteriose – Transmissionswege (modifiziert nach ALTEKRUSE et al., 1994)	15
Abb. 3	Fliessdiagramm zum Verfahrensablauf nach ISO 10272:1995 (E) (entnommen aus ISO, 1995)	24
Abb. 4	Probenmaterial (n = 153), gegliedert nach Tierart	36
Abb. 5	Versuchsaufbau Studie 1 (Fließdiagramm)	40
Abb. 6	Versuchsaufbau Studie 2 (Fließdiagramm)	47
Abb. 7	<i>Campylobacter</i> -Nachweisraten, gegliedert nach Tierart	55
Abb. 8	Speziesprävalenz bei Geflügelfleisch sowie bei Produkten der Tierarten Huhn und Pute	55
Abb. 9	<i>Campylobacter</i> -Nachweise in Abhängigkeit vom verwendeten Selektivanreicherungsmedium	56
Abb. 10	<i>Campylobacter</i> -Nachweise in Abhängigkeit von verwendetem Selektivanreicherungsmedium, Angebotszustand und der Produktart	56
Abb. 11	Ergebnisse der halbquantitativen <i>Campylobacter</i> -Bestimmung, gegliedert nach Produktgruppen	57

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Hildebrandt für die Überlassung des Themas, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin sowie seine jederzeit gewährte Gesprächsbereitschaft und Kritik.

Ebenso herzlich möchte ich Herrn Dr. J. Kleer für die fachliche Betreuung der Arbeit, zahlreiche hilfreiche Anregungen und seine stete, geduldige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

Für die Einweisung in die molekularbiologische Arbeitsmethodik im Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. I. Erol bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme und insbesondere Frau B. Müller, Frau M. Döhnert, Frau C. Galla, Frau C. Zilk und Herrn H. Klingbeil für die gewährte Unterstützung und für die gründliche Einarbeitung in die klassischen mikrobiologischen Verfahren.

Dir, liebe Annemarie, danke ich herzlichst für viele wertvolle Anregungen beim Abfassen dieser Arbeit sowie für unermüdliches Korrekturlesen und Deine moralische Unterstützung.

Selbständigkeitserklärung zur Dissertation

„Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von thermotoleranten *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch“

Hiermit versichere ich, alle Quellen und Hilfen in meiner Dissertation angegeben und auf dieser Grundlage die Arbeit selbstständig verfasst zu haben.

Sigmaringen, den 16.01.2008

Carsten Opfer