

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

**Mikrobielle Kontamination von Schlachtkörpern bei zwei deutschen  
Broilerschlachtbetrieben mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen sowie Analyse von  
Quellen für Kreuzkontaminationen**

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

**vorgelegt von  
Marko Rossow  
Tierarzt  
aus Vilppula, Finnland**

**Berlin 2015**

**Journal-Nr.: 3862**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Burkhard Malorny  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Peggy Braun

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

*Campylobacter, Salmonella, Enterobacteriaceae, broiler, slaughterhouses, typing, contamination, carcasses, pulsed field electrophoresis*

Tag der Promotion: 06.06.2016

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

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: 978-3-86387-728-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

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

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Geflügelfleisch</b>	<b>2</b>
2.1.1	Erzeugung weltweit und in Deutschland	2
2.1.2	Technischer Ablauf der Geflügelfleischgewinnung (Broiler)	3
2.1.3	Hygieneparameter bei der Geflügelfleischgewinnung	5
<b>2.2</b>	<b><i>Salmonella</i></b>	<b>9</b>
2.2.1	Taxonomie und Eigenschaften	9
2.2.2	Salmonellose des Menschen	10
2.2.3	Nachweis und Charakterisierung	11
2.2.4	Vorkommen bei Zucht- und Masthähnchen	13
2.2.5	Vorkommen im Hähnchenfleisch	14
<b>2.3</b>	<b><i>Campylobacter</i></b>	<b>16</b>
2.3.1	Taxonomie und Eigenschaften	16
2.3.2	Campylobacteriose des Menschen	17
2.3.3	Nachweis und Charakterisierung	18
2.3.4	Vorkommen bei Masthähnchen und im Hähnchenfleisch	20
<b>2.4</b>	<b>Bekämpfung von <i>Salmonella</i> und <i>Campylobacter</i></b>	<b>23</b>
2.4.1	Maßnahmen in der Primärproduktion	24
2.4.2	Maßnahmen vor der Schlachtung	26
2.4.3	Maßnahmen in der Schlachtung	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Material für die Probenahme</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Material für die bakteriologischen Untersuchungen</b>	<b>35</b>
3.2.1	Referenzstämme	35
3.2.2	Nährmedien	35
3.2.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte für die bakteriologischen Untersuchungen	36
<b>3.3</b>	<b>Material für die molekularbiologischen Untersuchungen</b>	<b>37</b>

3.3.1	Primer	37
3.3.2	Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen	38
3.3.3	Reagenzien und Chemikalien	38
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Probenahme in zwei Broilerschlachtbetrieben</b>	<b>40</b>
4.1.1	Probenahmestellen	41
4.1.2	Zeitlicher Ablauf der Probenahmen	44
<b>4.2</b>	<b>Probenvorbereitung</b>	<b>45</b>
4.2.1	Aufbereitung der Brühwasserproben	45
4.2.2	Aufbereitung der Nackenhautproben	45
4.2.3	Aufbereitung der Blinddarmproben	46
4.2.4	Aufbereitung der Tupferproben	46
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung der Anzahl an <i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Mini-MPN-Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>48</b>
4.5.1	Nicht-selektive Anreicherung im Mini-MPN	48
4.5.2	PCR-Screening auf <i>Salmonella</i> spp.	48
4.5.3	Selektive Anreicherung im Mini-MPN-Verfahren	51
4.5.4	Bestätigung verdächtiger, positiver Ansätze mittels PCR	51
4.5.5	Bestimmung des MPN-Wertes für <i>Salmonella</i> spp.	52
<b>4.6</b>	<b>Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in den Tupferproben</b>	<b>52</b>
<b>4.7</b>	<b>Typisierung der <i>Salmonella</i>-Isolate</b>	<b>53</b>
<b>4.8</b>	<b>Semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von <i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>54</b>
4.8.1	Herstellung einer Dezimalverdünnungsreihe in Preston-Bouillon	54
4.8.2	Isolierung von <i>Campylobacter</i> spp. auf mCCD-Agar	55
4.8.3	Bestätigung von <i>Campylobacter</i> spp.	55
4.8.4	Bestimmung des MPN-Wertes für <i>Campylobacter</i> spp.	56
4.8.5	Isolierung von <i>Campylobacter</i> spp. auf MHB-Agar	57
<b>4.9</b>	<b>Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. in den Tupferproben</b>	<b>57</b>

<b>4.10</b>	<b>Typisierung der <i>Campylobacter</i>-Isolate</b>	<b>57</b>
<b>4.11</b>	<b>Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>60</b>
<b>5.1</b>	<b>Aerobe mesophile Keimzahl</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	<b>62</b>
<b>5.3</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>64</b>
5.3.1	Anzahl an positiven Proben	64
5.3.2	Mini-MPN-Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von <i>Salmonella</i> spp.	65
5.3.3	Typisierung der <i>Salmonella</i> -Isolate	66
<b>5.4</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>67</b>
5.4.1	Anzahl an positiven Proben	67
5.4.2	Semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von <i>Campylobacter</i> spp.	69
5.4.3	Speziesdifferenzierung der <i>Campylobacter</i> -Isolate	71
5.4.4	Typisierung der <i>Campylobacter</i> -Isolate	72
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>75</b>
<b>6.1</b>	<b>Allgemeine mikrobiologische Parameter</b>	<b>76</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>77</b>
<b>6.3</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b>79</b>
<b>6.4</b>	<b>Empfehlungen und Ausblick</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	<b>110</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geflügelfleischerzeugung in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015)	2
Abbildung 2: Änderung der mittleren aeroben mesophilen Keimzahlen von Schlachtkörpern in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben (SB) im Laufe der Schlachtung	6
Abbildung 3: Änderung der mittleren <i>Enterobacteriaceae</i> -Keimzahlen von Schlachtkörpern in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben (SB) im Laufe der Schlachtung	7
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Salmonella</i> spp. (Quelle: Max Rubner-Institut)	10
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Campylobacter</i> spp. (Quelle: Max Rubner-Institut)	17
Abbildung 6: Stationen der Broilerschlachtung mit Markierung der Probenahmestellen für die Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben (schwarze Pfeile)	42
Abbildung 7: MSR/MSRV-Ansätze mit <i>Salmonella</i> -verdächtigen Kavitäten (6 x links) und nicht verdächtigen Kavitäten (6 x rechts) nach 48 h Inkubation bei 41,5 °C	51
Abbildung 8: Aerobe mesophile Keimzahlen der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb A. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima	61
Abbildung 9: Aerobe mesophile Keimzahlen der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb B. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima	62
Abbildung 10: Anzahl an <i>Enterobacteriaceae</i> der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb A. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima	63
Abbildung 11: Anzahl an <i>Enterobacteriaceae</i> der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb B. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima	64

- Abbildung 12: Dendrogramm-Darstellung der PFGE-Bandenmuster der *Salmonella* Paratyphi B-Isolate bei der Herde B1 in Betrieb B (die Zahlen sind Stammnummern; LM=Längenmarker) 67
- Abbildung 13: Anzahl an *Campylobacter* spp. der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) bei drei blinddarmpositiven Herden in Betrieb A. Boxplots mit Median (breite Linien), Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima 70
- Abbildung 14: Anzahl an *Campylobacter* spp. der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) bei zwei blinddarmnegativen und zwei blinddarmpositiven Herden in Betrieb B. Boxplots mit Median (breite Linien), Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima 71
- Abbildung 15: Gelelektrophorese-Bild des Nachweises von *Campylobacter* spp. mittels Multiplex-PCR in Anlehnung an Wang et al. (2002) und Chaban et al. (2009). M=Marker; *C. jejuni* (1, 4, 9, 12); *C. coli* (3, 8, 11); *C. lari* (2, 7, 10) 72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mikrobiologische Richt- und Warnwerte für im Verkehr befindliches rohes Geflügelfleisch, das nicht gewürzt wurde (DGHM, 2011)	9
Tabelle 2: Biochemische Merkmale zur Identifizierung von Salmonellen (in Anlehnung an Stephan et al., 2014)	12
Tabelle 3: Vorkommen von <i>Salmonella</i> spp. während der Broilerschlachtung	16
Tabelle 4: Vor- und Nachteile unterschiedlicher Genotypisierungsverfahren für die Typisierung von <i>Campylobacter</i> spp. nach Eberle und Kiess (2012)	20
Tabelle 5: Vorkommen von <i>Campylobacter</i> spp. während der Broilerschlachtung	22
Tabelle 6: Probenahmestellen für <i>Salmonella</i> in der Hähnchenfleischproduktion und zugehörige Rechtsvorschriften (modifiziert nach Mead et al., 2010)	23
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien für die Probenahme	35
Tabelle 8: Verwendete Referenzstämme	35
Tabelle 9: Verwendete Nährmedien	36
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien und Geräte für die bakteriologischen Untersuchungen	36
Tabelle 11: Sequenzen und Referenzen für verwendete Primer-Systeme	37
Tabelle 12: Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen	38
Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien für die molekularbiologischen Untersuchungen	38
Tabelle 14: Technische Merkmale der Schlachtbetriebe	40
Tabelle 15: Details zu den beprobten Herden in Betrieb A und in Betrieb B	41
Tabelle 16: Anzahl der gezogenen Proben in Betrieb A	43
Tabelle 17: Anzahl der gezogenen Proben in Betrieb B. Die graue Schattierung kennzeichnet die Probenziehung bei drei am gleichen Tag hintereinander geschlachteten Herden	44
Tabelle 18: Aufgetragene Probenvolumina für das Programm „Log Mode 100 µl“ des verwendeten Spiral-Plater-Systems (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Benutzerhandbuch Eddy Jet, 2001)	47

Tabelle 19: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern 139 und 141 für den Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. (Rahn et al., 1992)	49
Tabelle 20: Cycler-Programm für die Amplifikation des <i>invA</i> -Gens für den Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. (Rahn et al., 1992)	49
Tabelle 21: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern Hb 10 und Hb 11 für den externen PCR-Standard (Gallien et al., 1997)	50
Tabelle 22: Cycler-Programm für die Amplifikation der pUC 19-DNA (externer PCR-Standard) (Gallien et al., 1997)	50
Tabelle 23: Probeneinwaagen für die MPN-Berechnung für <i>Salmonella</i> spp.	52
Tabelle 24: Verdünnung, Anreicherungs-volumen und Probeneinwaage der Nackenhautproben in Preston-Bouillon	54
Tabelle 25: Verdünnung, Anreicherungs-volumen und Probeneinwaage der Blinddarm- und Brühwasserproben in Preston-Bouillon	54
Tabelle 26: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes für den PCR-Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. in Anlehnung an Wang et al. (2002)	56
Tabelle 27: Cycler-Programm für den Multiplex-PCR-Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. in Anlehnung an Wang et al. (2002)	56
Tabelle 28: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern FLA4F und FLA1728R (Meinersmann et al., 1997)	57
Tabelle 29: Cycler-Programm für die Amplifikation des <i>flaA</i> -Gens (Meinersmann et al., 1997)	58
Tabelle 30: <i>Salmonella</i> -Prävalenz in Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei zwei Herden in Betrieb A (A2 und A3) und zwei Herden in Betrieb B (B1 und B2)	65
Tabelle 31: Anzahl an <i>Salmonella</i> spp. in den Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei während der Schlachtung <i>Salmonella</i> -positiven Herden	66
Tabelle 32: Serologische Charakterisierung der <i>Salmonella</i> -Isolate nach dem White-Kauffmann-Le-Minor-Schema (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014)	66

Tabelle 33: <i>Campylobacter</i> -Prävalenz in Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben in Betrieb A (Herde A1, A2, A3 und A4) und in Betrieb B (Herde B1, B2, B3, B4, B5, B6 und B7)	68
Tabelle 34: <i>Campylobacter</i> -Prävalenz in Tupferproben von den Schlachtgeräten nach der Schlachtung von zwei Herden in Betrieb A (Herde A3 und A4) und zwei Herden in Betrieb B (Herde B4 und B7)	69
Tabelle 35: <i>flaA</i> -Typen der <i>Campylobacter jejuni</i> -Isolate bei vier an unterschiedlichen Tagen geschlachteten Broilerherden aus zwei verschiedenen Broilerschlachtbetrieben	73
Tabelle 36: Prozentualer Anteil detektierter <i>flaA</i> -Typen der <i>C. jejuni</i> -Isolate bei drei hintereinander geschlachteten Broilerherden aus Betrieb B	74
Tabelle 37: <i>flaA</i> -Typen der <i>C. jejuni</i> -Isolate bei drei hintereinander geschlachteten Broilerherden aus Betrieb B	74
Tabelle 38: Ergebnistabelle für die MPN-Anzahl an <i>Campylobacter</i> spp. in den Nackenhautproben (modifiziert nach ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E))	110
Tabelle 39: Ergebnistabelle für die MPN-Anzahl an <i>Campylobacter</i> spp. in den Brühwasser- und Blinddarmproben (modifiziert nach ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E))	110
Tabelle 40: Anzahl an <i>Campylobacter</i> spp. der Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei drei Herden in Betrieb A (Herde A1, A3 und A4) und vier Herden in Betrieb B (Herde B1, B2, B3 und B4). Die Werte sind durch mathematisches Runden auf- oder abgerundet	111

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
<i>A. bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
Abb.	Abbildung
Art. Nr.	Artikelnummer
a <sub>w</sub> -Wert	Wasseraktivität
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
bp	Basenpaar
BPW	Buffered Peptone Water
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DIASALM	Diagnostic Semi-solid Salmonella Agar
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ISO	International Organization for Standardization
Kap.	Kapitel
KbE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
l	Liter

LE	Low Electroendosmosis
log	Dekadischer Logarithmus
mCCDA	modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHB	Müller-Hinton-Blutagar
Mill.	Millionen
min	Minute
MKTTn	Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Anreicherungsbouillon
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPN	Most Probable Number
MSRV	Modified semisolid Rappaport Vassiliadis
n	Stichprobenumfang
ng	Nanogramm
p	Signifikanz
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Plate Count
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	PFGE=Pulsfeld-Gelelektrophorese
PubMLST	Public databases for molecular typing and microbial genome diversity
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	revolutions per minute
RV	Rappaport-Vassiliadis
S.	<i>Salmonella</i>
SAS	Statistics Analysis Systems
spp.	Spezies
subsp.	Subspezies
t	Tonnen
Tab.	Tabelle
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
U	Units
UV	ultraviolett
V	Volt
VBNC	Viable but non-culturable
vgl.	vergleiche
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat

## 1 Einleitung

Geflügelfleisch ist, gemessen an der Produktion und dem weltweiten Handel, eine der bedeutendsten Fleischkategorien (FAO, 2015). Der überwiegende Anteil des in Deutschland produzierten Geflügelfleisches geht auf Masthähnchen (Broiler) zurück (Statistisches Bundesamt, 2015). Dabei können in Hähnchen und in Hähnchenfleisch pathogene Bakterien - wie *Salmonella* und *Campylobacter* - vorkommen, die beim Menschen Erkrankungen auslösen können. Insbesondere Infektionen mit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* und mit *Campylobacter* spp. gehören zu den häufigsten Zoonosen in der Europäischen Union und in Deutschland. Der Verzehr von rohem Geflügelfleisch wird häufig mit den gemeldeten Erkrankungen in Verbindung gebracht (EFSA und ECDC, 2015).

Während der Broilerschlachtung kann es zur Kontamination der Hähnchenschlachtkörper mit *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. kommen. Besonders das Brühen, Entfedern und die Eviszeration gelten als Risikofaktoren für eine Kontamination der Schlachtkörper und damit des Hähnchenfleisches (Bryan und Doyle, 1995). Die Gewinnung des Geflügelfleisches kann in Schlachtbetrieben erfolgen, die sich hinsichtlich ihrer Betriebsstruktur oder in der Schlachttechnologie unterscheiden. Dies kann einen Einfluss auf die Kontamination des Hähnchenfleisches während der Schlachtung haben (Franz et al., 2012; Zweifel et al., 2015).

Kenntnisse über Kontaminationsrisikofaktoren während der Broilerschlachtung sind von Bedeutung, um gezielte Interventionsmaßnahmen während der Schlachtung einleiten zu können. In der vorliegenden Studie wurde die Kontamination der Schlachtkörper vergleichend bei zwei deutschen Schlachtbetrieben mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen untersucht. Um mögliche Kreuzkontaminationsquellen in den Schlachtbetrieben zu identifizieren, wurden neben den Schlachtkörpern auch Blinddarm-, Brühwasser- und Geräteproben entnommen. Das Ausmaß der Kontamination wurde anhand allgemeiner Hygieneparameter und anhand des Nachweises von *Salmonella* und *Campylobacter* beurteilt. Eine Genotypisierung der nachgewiesenen *Salmonella*- und *Campylobacter*-Isolate ermöglichte das Verfolgen von genetisch verwandten Stämmen entlang der Schlachtung. Im Rahmen der Studie sollte auch das quantitative Ausmaß der Kontamination von Hähnchenschlachtkörpern auf unterschiedlichen Stufen der Schlachtung beurteilt werden.

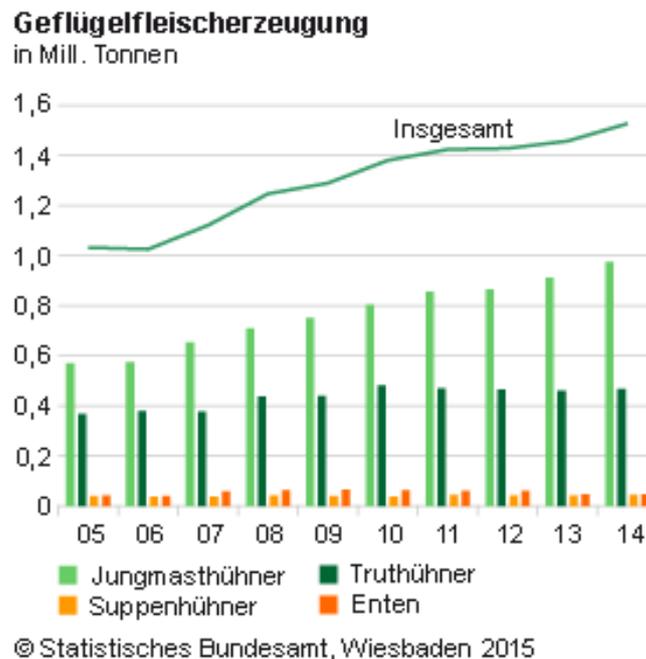
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geflügelfleisch

#### 2.1.1 Erzeugung weltweit und in Deutschland

Weltweit wurden im Jahr 2014 nach Schätzung der Food and Agriculture Organisation (FAO) etwa 110,2 Millionen Tonnen Geflügelfleisch (Nettoerzeugung) produziert. Der größte Produzent waren die USA (ca. 20,5 Mill. t), gefolgt von China (ca. 18,5 Mill. t), der Europäischen Union (ca. 13,2 Mill. t) und Brasilien (ca. 13,0 Mill. t). Mit einem Anteil von über 40 % war Geflügelfleisch noch vor Rind- und Schweinefleisch die weltweit am meisten gehandelte Fleischkategorie (FAO, 2015).

In Deutschland hat die Geflügelfleischerzeugung in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen. Während im Jahr 2005 etwa 1,0 Millionen Tonnen Geflügelfleisch produziert wurden, lag die geschätzte Menge für das Jahr 2014 bei etwa 1,5 Millionen Tonnen Schlachtgewicht (Nettoerzeugung, vgl. Abb. 1).



**Abbildung 1: Geflügelfleischerzeugung in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2015)**

Der überwiegende Anteil des erzeugten Geflügelfleisches stammt von Jungmasthühnern (63,7 %) und Truthühnern (30,5 %). Enten (2,9 %), Suppenhühner (2,7 %) und sonstiges Geflügel (0,2 %) stellen einen vergleichsweise kleineren Anteil dar (Statistisches Bundesamt, 2015). Im Jahr 2013 lag der Pro-Kopf-Verbrauch an Geflügelfleisch in Deutschland bei durchschnittlich 19,4 kg (BLE, 2014).

Die Aufzucht des Mastgeflügels in Deutschland erfolgt überwiegend in intensiver Bodenhaltung auf Einstreu (Stroh, Hobelspäne). Bei Broilern kommen meistens geschlossene Ställe mit Zwangsbelüftung und Kunstlicht zum Einsatz. Puten hingegen werden häufiger in Offenställen (Louisiana-Stall) mit natürlicher Wind- bzw. Schwerkraftlüftung gehalten. Alternative Haltungsformen sind die Freilandhaltung und die ökologische Haltung, bei der die Tiere Zugang zur Außenumgebung haben (EFSA, 2011; DLG, 2014).

### **2.1.2 Technischer Ablauf der Geflügelfleischgewinnung (Broiler)**

Bei den meisten Nutzgeflügelarten sind weitgehend dieselben technologischen Schritte zur Gewinnung des Fleisches notwendig. Im Folgenden wird der Ablauf bei der Fleischgewinnung von Masthähnchen (Broilern) beschrieben.

Je nach verwendeten Mastverfahren werden Broiler überwiegend zwischen dem 28. und 42. Lebenstag mit einem Mastendgewicht von etwa 1,5 bis 2,7 Kilogramm geschlachtet (DLG, 2014). In Deutschland regelt die Tierschutzschlachtverordnung zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 den Schutz der Tiere im Zusammenhang mit der Schlachtung. Demnach müssen Tiere, die in Behältnissen zur Schlachtung angeliefert werden, unverzüglich der Schlachtung zugeführt werden. Spätestens nach zwei Stunden Wartezeit müssen die Tiere getränkt bzw. nach sechs Stunden Wartezeit gefüttert werden (Anonymous, 2012).

Die Betäubung der Masthähnchen kann mit Gas oder als Elektrobetäubung in einem Wasserbad erfolgen. Bei der CAS (Controlled Atmosphere Stunning)-Methode werden die Tiere durch erhöhte Argon-, Stickstoff- oder Kohlendioxidgehalte in der Atemluft betäubt (McKeegan et al., 2007). Erst nach der Betäubung erfolgt das Aufhängen der Tiere in das Schlachtband. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Elektrobetäubung das Aufhängen der Tiere bei noch vollem Bewusstsein. Die Tiere werden kopfüber in ein Wasserbad mit Stromfluss geleitet, wobei der Strom durch den ganzen Tierkörper fließt (Löhren, 2012). Stromstärken von mindestens 120 mA werden aus Tierschutzgründen empfohlen, um eine augenblickliche und irreversible Betäubung zu erreichen (Fletcher et al., 1999). Als Nachteil der Elektrobetäubung kann die Verminderung der Fleischqualität durch Knochenbrüche und Hämorrhagien angesehen werden (Raj et al., 1992; Göksoy et al., 1999).

Nach der Tierschutzschlachtverordnung muss der Entbluteschnitt innerhalb von 30 Sekunden nach dem letzten Halt in der Kohlendioxidatmosphäre bzw. innerhalb von 20 Sekunden nach der Elektrobetäubung im Hängen erfolgen (Anonymous, 2012). Der Entbluteschnitt erfolgt entweder als seitlicher Schnitt mittels Durchtrennung der beiden Halsschlagarterien, als Kehlschnitt mit zusätzlicher Durchtrennung der Trachea und des

Oesophagus oder durch Dekapitation (Entfernen des Kopfes). Die Entblutungszeit kann je nach Betrieb und angewandten Verfahren zwischen 60 und 200 Sekunden liegen (Löhren, 2012).

Das anschließende Brühen der Broiler findet je nach Vermarktungsform des Geflügels in der Regel bei Temperaturen zwischen 52 °C und 59 °C statt (EFSA, 2011). Bei frisch vermarktetem Fleisch werden niedrigere Brühtemperaturen angewandt als bei Tiefkühlware. Je nach Brühsystem können Anlagen mit einem oder mehreren Brühtanks verwendet werden. In einigen Brühsystemen wird das Wasser in Gegenrichtung zu den Karkassen geleitet (Cason und Hinton, 2006). Das Brühen mit Wasserdampf wurde bei der Schlachtung von Puten- und Perlhühnern erfolgreich angewandt (Lillard et al., 1973). Die Schwierigkeit bei der Dampfbrühen von Broilern besteht aber vor allem in der schlechten Kontrollierbarkeit der Temperatur auf der Geflügelhaut (Lillard et al., 1973; Löhren, 2012).

Die während des Brühvorgangs gelockerten Federn werden im anschließenden Rupfprozess gelöst. Die Rupfanlagen bestehen aus mehreren Scheiben, an denen Rupffinger befestigt sind. Durch Drehen der Scheiben werden die Federn durch die Rupffinger gelöst und durch gleichzeitiges, kontinuierliches Sprühen mit Wasser von den Karkassen entfernt. Einige Anlagen arbeiten mit gegenläufig drehenden Scheiben, die vertikal oder horizontal gerichtet sein können (Cibin et al., 2014). Nach dem Rupfprozess kann ein zusätzlicher Waschschrift in Form eines Zusatzaußenwäschers eingeschaltet sein (Lehner, 2010).

Zur Beschleunigung der Reifung des Hähnchenfleisches und des Eintretens der Totenstarre nach der Schlachtung wird das Muskelfleisch mittels elektrischen Stroms stimuliert. Die Elektrostimulation ermöglicht das Entbeinen des Fleisches kurzfristig nach dem Kühlen, ohne dass die Zartheit des Fleisches verloren geht (Birkhold et al., 1993; Craig et al., 1999; Sams et al., 1999).

Der Ablauf bis zum Ende des Schlachtbandes gehört zur sogenannten unreinen Seite des Schlachtbetriebs. Nach dem meist automatischen Umhängen auf das Eviszerationsband beginnt die reine Seite des Produktionsprozesses. Davor können die Ständer der Tiere am Tarsalgelenk sowie die Köpfe abgeschnitten werden (Fries, 2001; Löhren, 2012). Die automatische Eviszierung beginnt mit dem Umschneiden der Kloake mittels eines Hohlmessers, des sogenannten Kloakenschneiders. Nachdem der Bauchhöhlenschnitt durch ein weiteres Messer verlängert wurde, können die Organe mittels eines Ausnehmebügels komplett herausverlagert werden. In der Regel werden die Organe der nachfolgenden Veterinärinspektion parallel zum Tierkörper laufend, aber getrennt davon, auf einer Schale oder auf einem Haken präsentiert (Fries, 2001; Löhren, 2012).

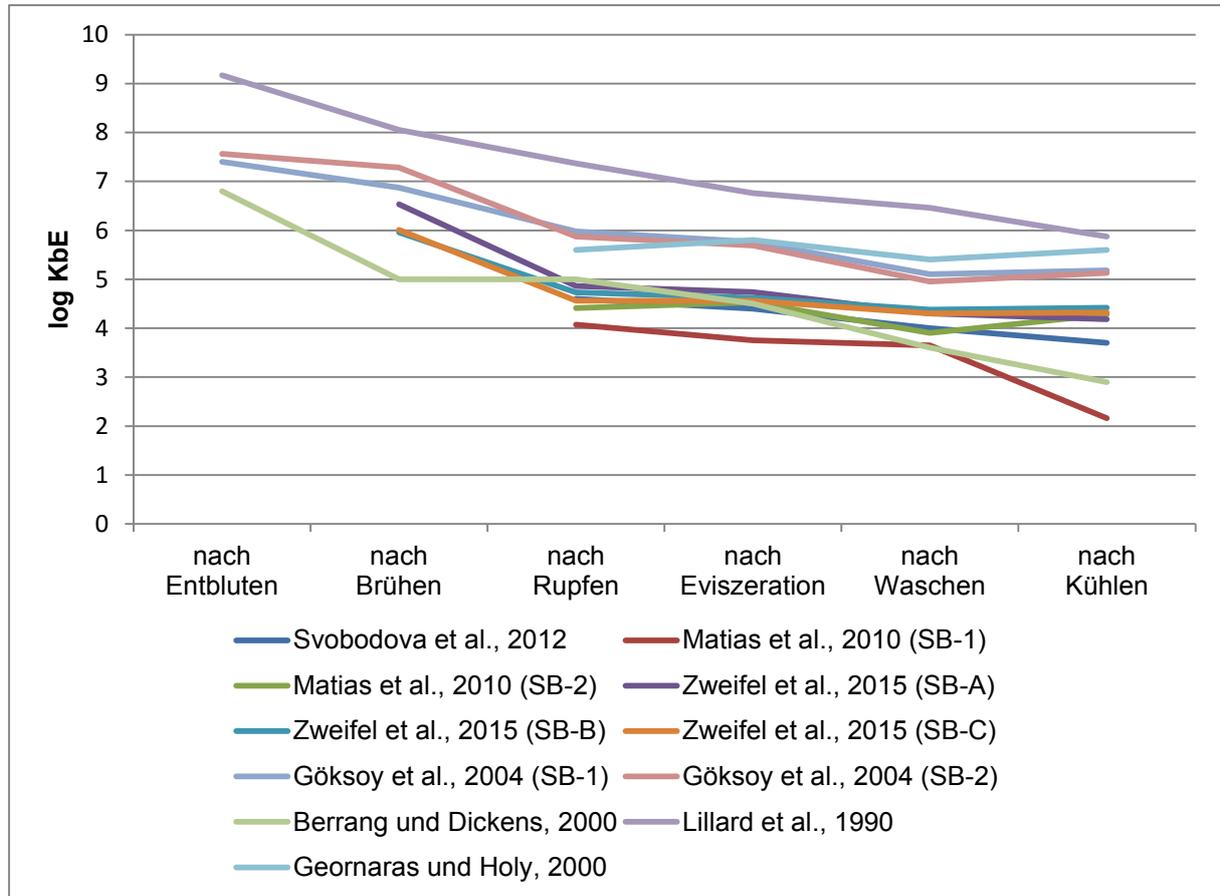
Bevor die Schlachtkörper in die Kühlung gelangen, werden nicht vollständig entfernte Organteile durch verschiedene Geräte entfernt. So wird ein Vakuumsauger zur Entfernung der Lunge oder ein Kropfkontrollgerät zur Entfernung von Geweberesten im Tierkörper verwendet. Auch die Halswirbelsäule und die Halshaut werden entfernt (Fries, 2001). Zur Säuberung der Karkassen erfolgt oft ein letzter Waschschrift durch einen Innen- und Außenwäscher (Li et al., 2002; Smith et al., 2005a). Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 regelt, dass Schlachtkörper nach der finalen Post-Mortem-Inspektion so schnell wie möglich auf unter 4 °C gekühlt werden müssen. Dies geschieht in der EU bei frischem Hähnchenfleisch meist durch Luftkühlung, während die Tauchkühlung vor allem in den USA häufiger zur Anwendung kommt (James et al., 2006; Russell, 2012).

### 2.1.3 Hygieneparameter bei der Geflügelfleischgewinnung

Die Anzahl an Mikroorganismen auf den zur Schlachtung zugeführten Tieren, aber auch verschiedene Schritte im Schlachtprozess, können einen Einfluss auf die mikrobiologische Belastung des Endproduktes haben (Brune und Cunningham, 1971; Clouser et al., 1995; Zweifel et al., 2015). Durch verschiedene Prozessschritte ändert sich nicht nur die Anzahl der Mikroorganismen auf den Geflügelkarkassen, sondern auch deren Zusammensetzung. So besteht die Mikroflora der Haut zu Beginn des Schlachtprozesses hauptsächlich aus Gram-positiven Bakterien (v.a. *Micrococcaceae*); im Laufe des Schlachtprozesses kommen vermehrt Gram-negative Bakterien und psychrotrophe Mikroorganismen dazu (Thomas und McMeekin, 1980).

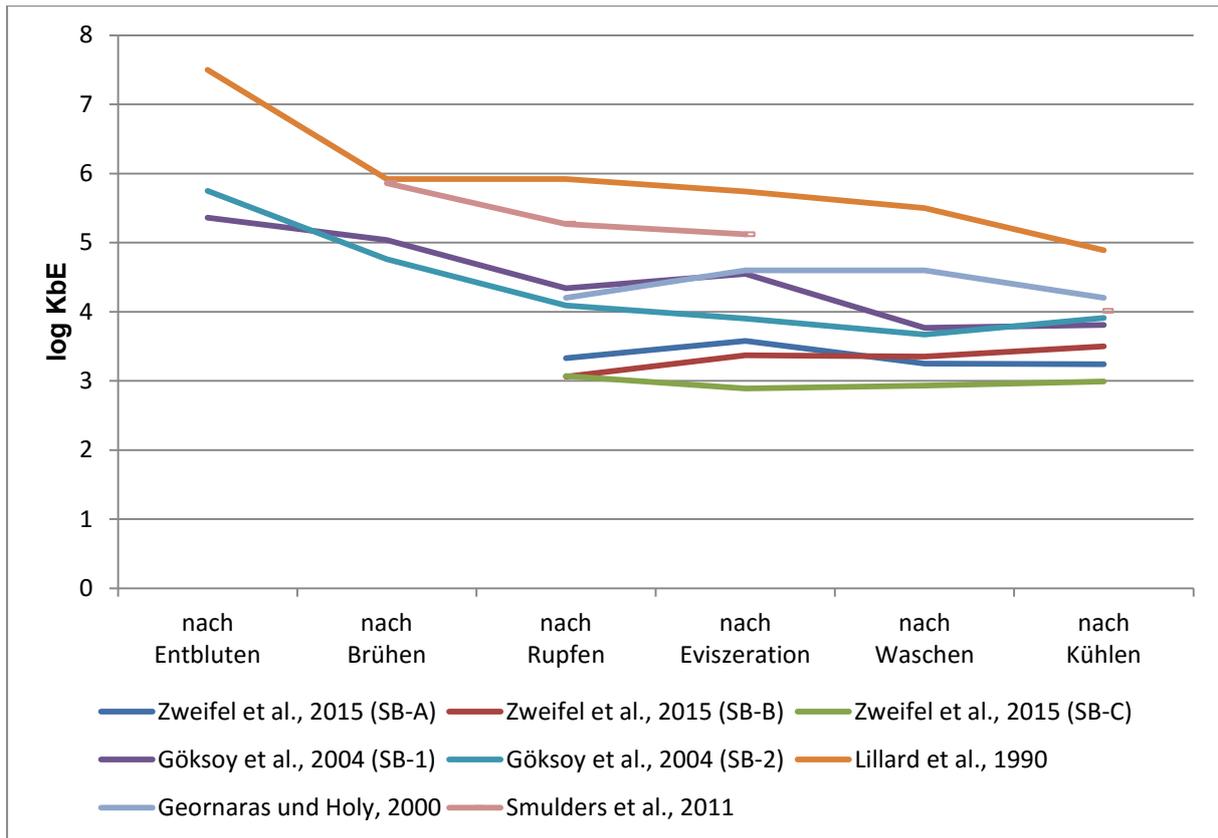
Eine Möglichkeit, um die Hygiene während der Geflügelfleischproduktion zu evaluieren, ist die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl. Zu Beginn des Schlachtprozesses – noch vor dem Brühen – weisen Schlachtkörper von Broilern hohe aerobe mesophile Keimzahlen von meist über 6,5 log KbE in den Haut-, Spül- oder Tupferproben auf (vgl. Abb. 2). Kotula und Pandya (1995) berichteten über mittlere aerobe mesophile Keimzahlen von etwa 8,0 log KbE/g vor dem Brühen. Das Brühen der Karkassen führt in der Regel zu einer Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahlen, während nach dem Rupfen sowohl über abnehmende als auch über zunehmende Keimzahlen berichtet wurde (Geornaras et al., 1997; Berrang und Dickens, 2000; Zweifel et al., 2015). Zum Ende des Schlachtprozesses hin nehmen die aeroben mesophilen Keimzahlen je nach Betrieb weiterhin ab oder ändern sich nur noch wenig (vgl. Abb. 2). Besonders durch das Waschen im Innen- und Außenwäscher und durch die Wasserkühlung von Karkassen reduzierten sich die aeroben mesophilen Keimzahlen teilweise signifikant (Göksoy et al., 2004; Smith et al., 2005a; Matias et al., 2010). Im Bereich der Putenschlachtung berichteten Clouser et al. (1995) über signifikante Reduktionen der aeroben mesophilen Keimzahlen um etwa eine log-Stufe jeweils nach dem Rupfen und nach dem Kühlen der Karkassen.

Abbildung 2 stellt die Änderung der mittleren aeroben mesophilen Keimzahlen in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben durch verschiedene Prozessschritte dar.



**Abbildung 2: Änderung der mittleren aeroben mesophilen Keimzahlen von Schlachtkörpern in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben (SB) im Laufe der Schlachtung**

Um das Ausmaß von fäkaler Verunreinigung während der Schlachtung zu beurteilen, wird häufig die Anzahl an *Enterobacteriaceae* oder bestimmter Vertreter, wie zum Beispiel die Anzahl an Coliformen- oder *E. coli*-Keimen, bestimmt (Whyte et al., 2003; Cason und Hinton, 2006; Barco et al., 2014). Abbildung 3 stellt die Änderung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben durch verschiedene Prozessschritte dar. Dabei zeigte sich meist eine Abnahme der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen nach dem Brühen, Rupfen und Waschen. Nach der Eviszeration und nach dem Kühlen wurde sowohl über Zunahmen als auch über Abnahmen der Keimzahlen berichtet (vgl. Abb. 3).



**Abbildung 3: Änderung der mittleren *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen von Schlachtkörpern in unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben (SB) im Laufe der Schlachtung**

Gill et al. (2005) verglichen den Einfluss unterschiedlicher Probenahmemethoden auf den Nachweis der aeroben mesophilen Keimzahlen, der Anzahl an Coliformen und der Anzahl an *E. coli* bei Broilerkarkassen. Dabei zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen der Entnahme einer Hautprobe aus unterschiedlichen Stellen des Schlachtkörpers und einer Karkassenspülprobe bei den jeweiligen Keimgruppen weniger als 0,5 log-Stufen betrug. Nach der Tupferprobenahme wurden bei etwa der Hälfte der Proben Unterschiede von über 0,5 log-Stufen in den Keimzahlen zwischen den unterschiedlichen Probenarten festgestellt (Gill et al., 2005). Auch durch Zhang et al. (2012) wurden keine signifikanten Unterschiede in den aeroben mesophilen Keimzahlen und in der Anzahl an *Enterobacteriaceae* zwischen der Hautprobe und der Spülprobe nachgewiesen. Die aeroben mesophilen Keimzahlen lagen im Mittel bei  $\log 4,30 \text{ KbE/cm}^2$  in der Hautprobe und bei  $\log 4,60 \text{ KbE/cm}^2$  in der Spülprobe bei nach der Eviszeration entnommenen Karkassen (Zhang et al., 2012).

Giombelli et al. (2013) fanden bei einem Vergleich der Nackenhautprobe, der Karkassenspülprobe und der Haut-Muskel-Probe keine signifikanten Unterschiede in den aeroben mesophilen Keimzahlen und *Enterobacteriaceae*-Zahlen. Jedoch wurden mittels der Karkassenspülprobe um 0,46 und 0,51 log-Stufen signifikant höhere *E. coli*-Zahlen auf

denselben Broilerkarkassen nachgewiesen als mit der Nackenhaut und Haut-Muskelprobe (Giombelli et al., 2013).

Cibin et al. (2014) untersuchten die Anzahl von *Enterobacteriaceae* und *E. coli* in sieben unterschiedlichen Broilerschlachtbetrieben in der EU. Dabei zeigte sich, dass Karkassen mit unter 2 kg und über 3 kg Gewicht stärker kontaminiert waren als Karkassen der mittleren Gewichtskategorie (2–3 kg). Weitere Faktoren, die die Kontamination mit *Enterobacteriaceae* und *E. coli* beeinflussten, waren der Anteil an ausgemusterten Tieren und intestinalen Rupturen innerhalb der Schlachtchargen sowie die Art der Rupfanlage des Schlachtbetriebes (Cibin et al., 2014).

Auch ein Monitoring der visuellen fäkalen Kontamination von Karkassen nach der Eviszeration kann als Indikator für die Schlachthygiene benutzt werden. Allerdings besteht oft keine direkte Korrelation zwischen der fäkalen Verunreinigung und dem Vorkommen von pathogenen Bakterien auf Karkassen (Cibin et al., 2014). Karkassen können auch ohne visuelle fäkale Kontamination mit *Enterobacteriaceae*, wie *Salmonella* oder *E. coli*, belastet sein (Bilgili et al., 2002; Jiménez et al., 2002; Jiménez et al., 2003).

Die Bestimmung bestimmter Indikatorkeime, wie der aeroben mesophilen Keimzahl, kann Hinweise über die Hygiene während der Geflügelschlachtung geben. Allerdings ist noch nicht eindeutig geklärt, inwieweit das Senken der Anzahl an bestimmten Indikatorkeimen auch zu einer Senkung der Anzahl an pathogenen Bakterien auf Geflügelkarkassen führt. Williams et al. (2015) werteten Daten von insgesamt 182 Schlachtbetrieben zur mikrobiellen Kontamination von Broilerkarkassen nach dem Rupfen und nach dem Kühlen aus. Die Autoren teilten die untersuchten Schlachtbetriebe nach der Höhe der Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahl im Laufe der Schlachtung in zwei Gruppen auf. Hähnenschlachtbetriebe mit höheren Reduktionen (>2,0 log-Stufen) der aeroben mesophilen Keimzahl zeigten eine um 0,91, 0,82 bzw. 0,87 log-Stufen höhere mittlere Reduktion von *E. coli*-, *Campylobacter*- bzw. *Salmonella*-Bakterien als Betriebe mit niedrigeren Reduktionen (<2,0 log-Stufen) der aeroben mesophilen Keimzahl (Williams et al., 2015). In einer Studie von Duffy et al. (2014) wurde eine signifikante Korrelation zwischen den *Campylobacter*- und den *E. coli*-Keimzahlen auf Hähnchenkarkassen nachgewiesen. Das Brühen der Hähnchenkarkassen führte zu einer Reduktion der *Campylobacter*-Keimzahlen um log 1,8 KbE/Karkasse und der *E. coli*-Keimzahlen um log 1,3 KbE/Karkasse (Duffy et al., 2014). Andere Studien fanden wiederum keine Korrelation zwischen der aeroben mesophilen Keimzahl, der Anzahl an *Enterobacteriaceae* oder *E. coli* und der Anzahl an *Salmonella* oder *Campylobacter* auf Broilerkarkassen (Kotula und Pandya, 1995; Cason et al., 1997; Zweifel et al., 2015).

In der EU-Verordnung 2073/2005 sind als Prozesshygienekriterien für Karkassen von Rindern, Ziegen, Schafen, Pferden und Schweinen die aerobe mesophile Keimzahl und die Anzahl an *Enterobacteriaceae* definiert. Für Broilerkarkassen ist bisher nur die Untersuchung von Salmonellen auf Nackenhäuten nach dem Kühlen als Prozesshygienekriterium angegeben. *Salmonella* spp. dürfen in 25 g Probe nicht nachweisbar sein (Anonymous, 2005).

Für im Verkehr befindliches rohes Geflügelfleisch wurden von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) Empfehlungen für mikrobiologische Richt- und Warnwerte veröffentlicht (vgl. Tab 1). Diese sind nicht rechtsverbindlich, können aber als Orientierung zur Identifizierung von Hygieneschwachstellen im Herstellungsprozess dienen (DGHM, 2011).

**Tabelle 1: Mikrobiologische Richt- und Warnwerte für im Verkehr befindliches rohes Geflügelfleisch, das nicht gewürzt wurde (DGHM, 2011)**

	Richtwert (KbE*/g)	Warnwert (KbE*/g)
Aerobe mesophile Koloniezahl	$5 \times 10^6$	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i>	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^3$
Pseudomonaden	$1 \times 10^6$	-
Koagulase-positive Staphylokokken	$5 \times 10^2$	$5 \times 10^3$
<i>Salmonella</i>	-	n.n.** in 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	$1 \times 10^2$

\*KbE= Koloniebildende Einheit

\*\*n.n.= nicht nachweisbar

## 2.2 *Salmonella*

### 2.2.1 Taxonomie und Eigenschaften

Salmonellen gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* (vgl. Abb. 4). Unter dem Mikroskop zeigen sie sich nach Gramfärbung als Gram-negative, meist peritrich begeißelte und nicht-sporenbildende Stäbchenbakterien (Le Minor und Popoff, 1987). Salmonellen können fakultativ aerob wachsen. Die optimalen Wachstumsbedingungen für Salmonellen liegen bei etwa 30 bis 45 °C und bei pH-Werten in einem neutralen Bereich. Eine Vermehrung von Salmonellen ist bei Temperaturen zwischen etwa 5 und 47 °C und bei pH-Werten zwischen etwa 5,0 und 9,0 möglich (D'Aoust, 1991; Foster, 1991). Salmonellen wachsen optimal bei  $a_w$ -Werten von etwa 0,99; einige Stämme können auch bei niedrigen  $a_w$ -Werten von etwa 0,92 noch überleben (Mattick et al., 2000).



**Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. (Quelle: Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut)**

Bakterien der Gattung *Salmonella* werden in zwei Spezies, *S. enterica* und *S. bongori*, eingeteilt. Zu der Spezies *S. enterica* gehören wiederum sechs Subspezies (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica*) (vgl. Guibourdenche et al., 2010). Zusätzlich werden Salmonellen nach dem White-Kauffmann-Le-Minor-Schema anhand der Agglutination des O-Antigens und des H-Antigens mit spezifischen Antisera charakterisiert. Dadurch erfolgt eine Einteilung in Serovaren, die durch eine spezifische Antigenformel oder im Falle von *S. enterica* subsp. *enterica*-Serovaren anhand eines Namens (z.B. *Salmonella* Infantis) angegeben werden. Im Jahr 2014 wurden so insgesamt 2659 *Salmonella*-Serovaren beschrieben; mit insgesamt 1586 Serovaren gehören die meisten dieser Serovaren zu *S. enterica* subsp. *enterica* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

### 2.2.2 Salmonellose des Menschen

Infektionen mit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* gehören neben Infektionen mit *Campylobacter* spp. zu den häufigsten Zoonosen in der EU und in Deutschland (RKI, 2015; EFSA und ECDC, 2015). Zu einer Übertragung kommt es in der Regel durch die orale Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser (Uzzau et al., 2000). Für eine Erkrankung nach der oralen Aufnahme kann bei einer Salmonellose eine Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren verantwortlich sein, die eine Anheftung (Adhäsion) und das Eindringen (Invasion) in Darmepithelzellen ermöglichen. Die dafür erforderlichen Gene liegen häufig auf spezifischen Genabschnitten, den sogenannten Pathogenitätsinseln, die neben der krankmachenden Wirkung auch die Biofilmbildung beeinflussen können (Que et al., 2013).

Die ausschließlich an den Menschen adaptierten Serotypen *S. Typhi* und *S. Paratyphi* sind Erreger des Typhus bzw. Paratyphus. Diese Erkrankungen sind durch eine systemische,

fieberhafte Erkrankung gekennzeichnet. Durch andere Serovare ausgelöste Erkrankungen des Menschen werden durch sogenannte nichttyphoidale Serovare ausgelöst. Dabei ist die Erkrankung in der Regel durch eine auf den Darm beschränkte Enteritis mit Durchfall charakterisiert (Uzzau et al., 2000; Santos et al., 2014).

In den letzten Jahren haben Infektionen mit Salmonellen beim Menschen in der EU und in Deutschland kontinuierlich abgenommen (EFSA und ECDC, 2015; RKI, 2015). Im Jahr 2013 wurden noch insgesamt 82.694 bestätigte Salmonellosefälle in der EU gemeldet - 7,9 % weniger als im Jahr 2012. Die am häufigsten isolierten Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* waren für 39,5 % und 20,2 % der gemeldeten Erkrankungsfälle verantwortlich, verzeichneten jedoch eine Abnahme von 14,1 % (*S. Enteritidis*) bzw. 11,1 % (*S. Typhimurium*) im Vergleich zu den Vorjahren (2012 und 2011). Ausbrüche mit Salmonellen wurden am häufigsten mit dem Verzehr von Eiern und Eiprodukten (44,9 %), Süßwaren und Schokolade (10,5 %) sowie mit Schweinefleisch und -produkten (8,9 %) in Verbindung gebracht. Der Verzehr von Broilerfleisch und -produkten von *Gallus gallus* Zuchtherden war auf 5,1 % der Ausbrüche zurückzuführen (EFSA und ECDC, 2015).

### 2.2.3 Nachweis und Charakterisierung

Der Nachweis von *Salmonella* spp. erfolgt routinemäßig mittels standardisierter Referenzverfahren. In verschiedenen EU-Rechtsnormen (VO (EG) 200/2010, VO (EG) 200/2012, VO (EG) 2073/2005) wird zur Beprobung von Salmonellen beim Geflügel die Referenzmethode nach DIN EN ISO 6579 vorgeschrieben. Auch andere, nach EN/ISO 16140 validierte Verfahren können angewandt werden (Anonymous, 2005; Anonymous, 2010; Anonymous, 2012). Nach EN ISO 6579 werden in der Regel 25 g oder 25 ml Probenmaterial mit der neunfachen Menge eines nichtselektiven Anreicherungsmediums (gepuffertes Peptonwasser) homogenisiert und 24 h bei 37 °C bebrütet. Dieser Voranreicherungsschritt kann die Isolationsrate von *Salmonella* spp. erhöhen, weil subletal geschädigte Zellen wiederbelebt werden können (Edel und Kampelmacher, 1973). Nach der Voranreicherung erfolgt eine selektive Anreicherung in Rappaport-Vassiliadis (RV)-Bouillon mit Soja (24 h, 42 °C) sowie in Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin (MKKTn)-Bouillon (24 h, 37 °C). Für die Isolierung auf feste Nährmedien wird Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar sowie ein zweites Medium nach Wahl verwendet. Anschließend werden einzelne verdächtige Kolonien auf ein Nähragar ausgestrichen, um Reinkulturen zu erhalten, die für die biochemische und serologische Bestätigung notwendig sind (vgl. Tab. 2; ISO, 2007).

**Tabelle 2: Biochemische Merkmale zur Identifizierung von Salmonellen (in Anlehnung an Stephan et al., 2014)**

Biochemische Eigenschaft	Ergebnis
Oxidase	negativ
Katalase	positiv
Indol-Bildung	negativ
Urease	negativ
H <sub>2</sub> S-Bildung	positiv
Laktosefermentation	negativ (Ausnahme: <i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae/diarizonae</i> )
Methylrot-Reaktion	positiv
Citratverwertung	positiv (Ausnahme: <i>Salmonella</i> Typhi, Gallinarum, Sendai)
Voges-Proskauer-Test	negativ
Lysin-Decarboxylase	positiv
Ornithin-Decarboxylase	positiv (Ausnahme: <i>Salmonella</i> Typhi)

De Smedt et al. (1986) modifizierten aus dem flüssigen RV-Medium ein halbfestes Modified semisolid Rappaport Vassiliadis-Medium (MSRV). In diesem konnte die Beweglichkeit von Salmonellen durch Trübung des Nährmediums nachgewiesen werden, während das enthaltene Novobiocin die Begleitflora unterdrückte (De Smedt et al., 1986). Voogt et al. (2001) verglichen das RV-Medium mit dem halbfesten MSRV-Medium und dem Diagnostic Semi-solid *Salmonella*-Agar (DIASALM) zur Isolierung von Salmonellen aus Fäzes von Broilern und Legehennen. Die halbfesten Medien zeigten bei beiden Tiergruppen eine höhere Nachweisrate für *Salmonella* spp. als das RV-Medium: Nach Anreicherung im RV-Medium wiesen 60 % der Broilerproben Salmonellen auf, während in DIASALM 88 % und im MSRV-Medium 93 % der Proben positiv waren (Voogt et al., 2001).

Um Salmonellen mittels kultureller Methoden zu quantifizieren, kann entweder ein direkter Ausstrich der Verdünnung auf selektiven Nährböden wie dem XLD-Agar oder eine Most-Probable-Number (MPN)-Methode angewandt werden. Der direkte Ausstrich eignet sich dabei für den Nachweis von *Salmonella*-Zahlen von über 100 KbE/g bzw. über 100 KbE/ml, allerdings ist die Sensitivität geringer als bei Methoden mit Voranreicherung (Jørgensen et al., 2002; Malorny et al., 2008; Brichta-Harhay et al., 2008). Brichta-Harhay et al. (2008) führten eine Keimzählung mittels direkten Ausstreichens sowie eine Anreicherung bei Karkassenspülproben von Broilern aus der Schlachtung durch. Dabei zeigte sich, dass mittels Anreicherung 95 bis 100 % der Karkassen vor dem Kühlen *Salmonella* positiv waren, während durch das direkte Ausstreichen etwa 50 % derselben Karkassen ein positives Ergebnis zeigten. Bei den Karkassenspülproben nach dem Kühlen wurden in 41,7 % der

Karkassen Salmonellen mittels Anreicherung und in 28,3 % der Karkassen Salmonellen mittels direktem Ausstrich und Keimzählung nachgewiesen (Brichta-Harhay et al., 2008).

Zur Durchführung der MPN-Methode werden Dezimalverdünnungen der Probe in einem Drei- oder Fünffachansatz angelegt und der Nachweis erfolgt entsprechend DIN EN ISO 6579 (Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp.). Die Berechnung der Keimzahl in MPN/g erfolgt anhand der Anzahl positiver Verdünnungen unter Berücksichtigung der jeweiligen Menge der Probe in der Verdünnung (Malorny et al., 2008). Fravallo et al. (2003) entwickelten eine Mini-MPN-Methode, die den semiquantitativen Nachweis geringer *Salmonella*-Keimzahlen auf unterschiedlichen Stufen der Lebensmittelkette ermöglicht, aber mit weniger Material- und Zeitaufwand verbunden ist als die klassischen MPN-Methoden. Dabei erfolgte die Verdünnung der Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser auf 12-Well-Mikrotiterplatten unter Zuhilfenahme von Multikanalpipetten. Die Autoren testeten die Nachweismethode an 120 Nackenhautproben von *Salmonella*-positiven Putenherden und konnten bei neun der untersuchten Nackenhautproben eine Keimzahl von jeweils weniger als 10 MPN/g nachweisen (Fravallo et al., 2003).

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine Standardmethode zur Typisierung von *Salmonella*-Isolaten bei epidemiologischen Fragestellungen und bei Ausbruchsgeschehen (Zou et al., 2010). Sie beginnt mit einer Isolierung und Aufspaltung der DNA mittels eines Restriktionsenzym. Nach dem standardisierten PulsNet Protokoll wird hierfür das Enzym *Xba*I als primäres Enzym verwendet. Als zweites und drittes Enzym sind *Avr*II und *Spe*I aufgeführt, falls die PFGE-Muster mit dem primären Enzym nicht unterscheidbar sind. Die Auftrennung der gespaltenen DNA-Fragmente erfolgt im elektrischen Feld mit periodischen Richtungswechseln für 18 bis 19 oder 19 bis 20 Stunden je nach angewandtem Elektrophorese-Gerät. Anschließend erfolgt eine Färbung und visuelle Sichtbarmachung des PFGE-Musters (CDC, 2013). Genetische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen *Salmonella*-Isolaten lassen sich mittels PFGE entlang der Lebensmittelkette oder der Schlachtung verfolgen (Kim et al., 2007; Rasschaert et al., 2008).

### **2.2.4 Vorkommen bei Zucht- und Masthähnchen**

Für die Mitgliedstaaten der EU gilt mit Einführung der Verordnung (EG) 2160/2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern das Ziel der Senkung der Prävalenz von *Salmonella*-Serotypen, die von Belang für die öffentliche Gesundheit sind (vgl. Anhang 3 der VO (EG) 2160/2003). Die dazu durchgeführten Bekämpfungsmaßnahmen sollen alle Stufen vom Erzeuger zum Verbraucher umfassen (Anonymous, 2003). So besteht nach der VO (EG) 200/2010 zur Durchführung der

Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 das Ziel der Senkung der fünf beim Menschen am häufigsten auftretenden Serotypen (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium* bzw. *S. Virchow*) auf  $\leq 1$  % bei erwachsenen *Gallus-gallus*-Zuchtherden (Anonymous, 2010). Dieses Ziel wurde im Jahr 2013 von 22 EU-Mitgliedstaaten sowie von Island, Norwegen und der Schweiz erreicht. Insgesamt wurden im Jahr 2013 in nur 0,36 % der getesteten Zuchtherden die fünf häufigsten Serovare nachgewiesen, sodass die Prävalenzen seit dem Jahr 2007 (1,4 % positiver Herden) rückläufig sind. Im Jahr 2013 betrug der Anteil aller nachgewiesener *Salmonella*-Serovare in 23.783 getesteten Zuchtherden aus Ländern, die Kontrollmaßnahmen entsprechend der Verordnung 2160/2003 durchführen, 1,1 % (EFSA und ECDC, 2015).

Auch die Prävalenz von *Salmonella* spp. in Masthähnchenherden zeigte in den letzten Jahren einen rückläufigen Trend in der EU. Die in der VO (EG) 200/2012 definierten Ziele zur Senkung der Prävalenz von *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* auf  $\leq 1$  % wurden von 26 Mitgliedstaaten sowie von Island, Norwegen und der Schweiz erfüllt. Insgesamt waren von 234.052 untersuchten Herden 3,7 % *Salmonella* spp.- positiv. Die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* wurden in 0,2 % der beprobten Herden nachgewiesen (EFSA und ECDC, 2015).

In Deutschland besteht nach der Geflügel-Salmonellen-Verordnung die Pflicht zur Durchführung von betriebseigenen Kontrollen in Brütereien, Zucht-, Aufzucht-, Legehennen-, Hähnchenmast- und Putenbetrieben. Bei positiven Befunden besteht für Brütereien und Zuchtbetriebe die Pflicht zur Mitteilung des Verdachts auf eine Infektion mit Salmonellen der Kategorie 1 (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), der Kategorie 2 (*S. Hadar*, *S. Virchow* und *S. Infantis*) oder mit *Salmonella Gallinarum Pullorum*. Für Aufzucht-, Mast- und Legehennenbetriebe gilt die Mitteilungspflicht für Salmonellen der Kategorie 1 und *Salmonella Gallinarum Pullorum*. Ausgenommen von der Mitteilungspflicht sind die jeweiligen Impfstämme (Anonymous, 2014). So wurden im Jahr 2013 bei 2,1 % von 705 getesteten Zuchthühnerherden bekämpfungsrelevante *Salmonella*-Serovare gemeldet, sodass das EU-Ziel von  $\leq 1$  % positiver Herden überschritten wurde. Von 22.216 untersuchten Masthähnchenherden waren 1,5 % *Salmonella* spp.-positiv (EFSA und ECDC, 2015).

### 2.2.5 Vorkommen im Hähnchenfleisch

Das Vorkommen von Salmonellen in Hähnchenfleisch wird durch die Beprobung während der Schlachtung, während des Zerlegens oder im Einzelhandel überwacht. In der EU betrug im Jahr 2013 der Anteil positiver Proben aus diesen drei Stufen der Produktion insgesamt 3,5 % (EFSA und ECDC, 2015). In Deutschland wurden entsprechende

Prävalenzuntersuchungen im Rahmen des Zoonosenmonitorings im selben Jahr durchgeführt: In insgesamt 11,5 % der Halshautproben aus dem Schlachthof, 5,8 % der frischen Hähnchenfleischproben aus Verarbeitungsbetrieben und 4,0 % der Proben aus dem Einzelhandel wurden Salmonellen nachgewiesen (BVL, 2015). Dabei wurden nur in 1,0 % der Blinddarmproben derselben Herden *Salmonella* spp. nachgewiesen, was darauf hinweist, dass der Schlachtprozess die Kontaminationsrate erhöhte (BVL, 2015). In einer belgischen Studie von Rasschaert et al. (2008) nahm die Anzahl an *Salmonella*-positiven Herden nach der Schlachtung ebenfalls zu. Die Autoren wiesen bei 7 von 56 (13 %) untersuchten Herden *Salmonella* spp. im Darmtrakt bei der Schlachtung nach. Nach der Schlachtung waren die Karkassen von 31 (55 %) Herden *Salmonella* positiv. In 138 von 1220 (12 %) aller nach der Eviszeration gezogenen Nackenhautproben wurden *Salmonella* nachgewiesen (Rasschaert et al., 2008).

Je nach Schlachtbetrieb kann die *Salmonella*-Belastung von Broilerkarkassen unterschiedlich hoch sein (Heyndrickxs et al., 2002; Franz et al., 2012). Auch kann die durchgeführte Probenahmemethode die Nachweisrate beeinflussen. Typische Proben für den Nachweis von *Salmonella* in Broilerkarkassen sind die Nackenhautprobe, die Karkassenspülprobe und die Haut-Muskel-Probe. Giombelli et al. (2013) fanden zwischen den drei Probenahmeverfahren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Nachweises von *Salmonella* spp. Salmonellen wurden in 10,0 % der Haut-Muskel-Proben, in 11,3 % der Karkassenspülproben und in 15,0 % der Nackenhautproben bei jeweils denselben Karkassen nachgewiesen (Giombelli et al., 2013). In der Studie von Cox et al. (2014) wurden in insgesamt 52 % der Nackenhautproben und 60 % der Spülproben von nach der Eviszeration beprobten Karkassen Salmonellen detektiert. Nach der Kühlung waren jeweils 5 % der Nackenhaut- und der Spülproben *Salmonella* positiv (Cox et al., 2014).

Das Vorkommen von *Salmonella* spp. im Brühwasser und auf den Schlachtkörpern im Laufe der Broilerschlachtung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Vorkommen von *Salmonella* spp. während der Broilerschlachtung

<i>Salmonella</i> -Prävalenz % (Keimzahlmittelwerte)							
Referenz	BW	B	R	E	W	K	Material
Lillard et al. (1990)		11,9	11,9	14,3	14,3	36,9	Spülprobe
Carramiñana et al. (1997)	75,0		55,0	60,0	70,0	60,0	Tupferprobe
Cason et al. (1997)			23,3		20,0	19,0	Spülprobe
Reiter et al. (2007)	16,7	0	0	6,7	0	3,3	Hautprobe/ Muskelprobe
Berrang et al. (2008a)			59,0			11,0	Spülprobe
Matias et al. (2010)			3,7	11,1	14,8	3,7	Tupferprobe/ Betrieb 1
			0	6,7	6,7	6,7	Tupferprobe/ Betrieb 2
Brichta-Harhay et al. (2008)				95 (1,56)	100 (0,75)	41,7 (-1,29)	Spülprobe <sup>1</sup>
Svobodova et al. (2012)			(2,11)	(1,56)	(< 1.53)	(< 1.08)	Spülprobe <sup>2</sup>
Berghaus et al. (2013)			43,0 (2,77)		18,2 (2,57)	2,4 (2,32)	Spülprobe <sup>2</sup>
Rivera-Pérez et al. (2014)		30,0 (3,6)	30,0 (3,9)	40,0 (3,9)	10,0 (5,1)	10,0	Spülprobe <sup>3</sup>

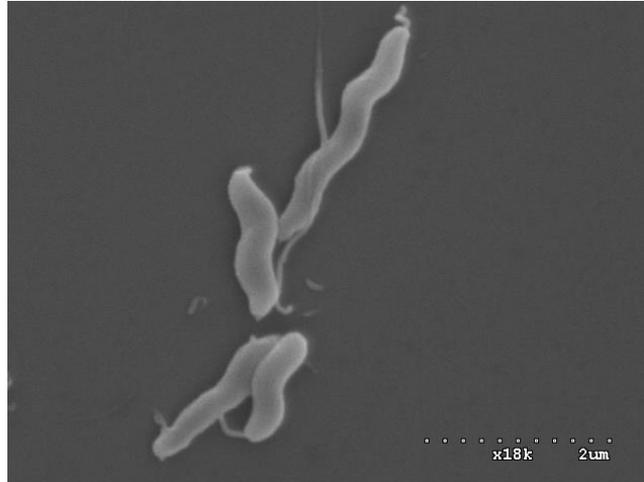
BW=Brühwasserproben, Schlachtkörperproben (B=nach Brühen, R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen), <sup>1</sup>Keimzahl in log KbE/ml, <sup>2</sup>Keimzahl in log MPN/Karkasse, <sup>3</sup>Keimzahl in log KbE/Karkasse

## 2.3 *Campylobacter*

### 2.3.1 Taxonomie und Eigenschaften

*Campylobacter* gehören zur Familie der *Campylobacteriaceae*, zu der auch die Gattungen *Arcobacter* und *Sulfurospirillum* gehören. Sie sind Gram-negative, nicht-sporenbildende, s-förmige oder spirilige Stäbchen mit einer uni- oder bipolaren Begeißelung und einer Länge von bis zu 5 µm (vgl. Abb. 5). Unter einem Lichtmikroskop ist bei frischen Kulturen eine ausgeprägte Beweglichkeit erkennbar, während bei älteren Kulturen degenerierte, kokkoide Zellformen auftreten können. Bei ungünstigen Umweltbedingungen können *Campylobacter* spp. in ein sogenanntes viable but non-culturable (VBNC)-Stadium übergehen. In diesem Zustand sind *Campylobacter* weiterhin überlebensfähig und potentiell infektiös, aber nicht mehr durch kulturelle Methoden anzüchtbar. Das Wachstumsoptimum von *Campylobacter*

spp. liegt bei Temperaturen zwischen 30 und 42 °C. Nach einer 48-stündigen Anreicherung in einer mikroaeroben Atmosphäre bilden sich auf festen Nährböden meist graue und flache Kolonien, die über dem Agar schwärmen können (Sebald und Véron, 1963; Rollins und Colwell, 1987; Corry et al., 1995; Baylis et al., 2000).



**Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Campylobacter* spp. (Quelle: Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Max Rubner-Institut)**

Die Gattung *Campylobacter* umfasst derzeit insgesamt 33 Spezies (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, September 2015). Dabei sind *C. jejuni* und *C. coli* die wichtigsten humanpathogenen Spezies (RKI, 2015).

### 2.3.2 Campylobacteriose des Menschen

Die Campylobacteriose des Menschen tritt weltweit und meist sporadisch auf. Der Großteil der Infektionen wird mit dem Verzehr von Lebensmitteln in Verbindung gebracht. Vor allem der Verzehr von rohem Hähnchenfleisch und nicht pasteurisierter Milch gelten als Risikofaktoren (Schmid et al., 1987; Wingstrand et al., 2006; Domingues et al., 2012). Zu einer Übertragung kann es auch durch den direkten Kontakt mit lebenden Tieren kommen. So wurde *C. jejuni* aus Fäzes von zahlreichen Haustieren, darunter Rindern, Schafen, Schweinen, Pferden, Hühnern, Hunden und Katzen, isoliert (Devane et al., 2005; Gilpin et al., 2008; Moriarty et al., 2015). Daneben sind sporadische Infektionen über kontaminiertes Wasser oder direkten Kontakt mit infizierten Personen dokumentiert (Blaser et al., 1983; Skirrow, 1991).

In experimentellen Untersuchungen wurde gezeigt, dass bereits die Aufnahme von wenigen hundert Keimen eine Erkrankung beim Menschen auslösen kann (Robinson et al., 1981; Black et al., 1988). Nach einer Inkubationszeit von ein bis sieben Tagen können klinische Symptome auftreten, die meist von wässrigen bis blutigen Durchfällen mit Fieber, Müdigkeit sowie Bauch- und Kopfschmerzen gekennzeichnet sind. In der Regel klingen die Symptome

innerhalb weniger Tage ab, jedoch kann es selten zu Komplikationen wie dem mit akuten Lähmungen einhergehenden Guillain-Barré Syndrom kommen, an dem Schätzungen zufolge etwa 0,1 % von mit *C. jejuni* infizierten Personen erkranken (Allos, 1997). Das durch reaktive Arthritiden gekennzeichnete Reiter Syndrom tritt bei etwa 1,0 % der *Campylobacteriose*-Fälle auf (Peterson et al., 1994; Altekruze et al., 1999). In Industrieländern ist eine saisonale Zunahme der Erkrankungsfälle in den Sommermonaten zu beobachten (Blaser et al., 1983; EFSA und ECDC, 2015). Dabei können alle Altersklassen an *Campylobacteriose* erkranken (Skirrow, 1991). In Deutschland war im Jahr 2014 die Inzidenz bei Kleinkindern unter drei Jahren und bei Erwachsenen zwischen 20 und 29 Jahren mit jeweils etwa 120 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern am höchsten (RKI, 2015).

Im Jahr 2013 wurden ca. 214.779 humane *Campylobacter*-Infektionen in der EU gemeldet. Bei den meisten gemeldeten *Campylobacter*-Erkrankungen wurden *C. jejuni* (80,6 %) und *C. coli* (7,1 %) isoliert, während *C. lari*, *C. fetus*, und *C. upsaliensis* bei jeweils weniger als 1,0 % der Infektionen nachgewiesen wurden (EFSA und ECDC, 2015). In Deutschland wurden im Jahr 2014 insgesamt 70.972 *Campylobacter*-Erkrankungen an das Robert Koch-Institut gemeldet. Somit war die *Campylobacter*-Enteritis nach Norovirusinfektionen der zweithäufigste Auslöser von mikrobiell bedingten Durchfallerkrankungen in Deutschland (RKI, 2015).

### 2.3.3 Nachweis und Charakterisierung

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. mittels kultureller Nachweismethoden erfolgt in einer mikroaeroben Atmosphäre. Sauerstoffkonzentrationen von 5 bis 10 % und Kohlenstoffdioxidkonzentrationen von 1 bis 10 % sind für das Wachstum vieler Biotypen geeignet (Bolton und Coates, 1983). Um *Campylobacter* spp. vor toxischen Sauerstoffverbindungen zu schützen, werden dem Nährmedium Blut, Kohle oder eine Mischung aus Eisensulfat, Natriummetabisulfit und Natriumpyruvat (FBP) zugesetzt (Bolton et al., 1984; Corry et al., 1995).

Zum Nachweis von *Campylobacter* spp. bei ungünstigen Umweltbedingungen oder bei einer hohen Begleitflora in der Probe wird eine Anreicherung empfohlen (Waage et al., 1999; Newell et al., 2001). Als Anreicherungsmedien für den Nachweis von *Campylobacter* spp. nach DIN EN ISO 10272-1:2015 werden die Bolton-Bouillon und die Preston-Bouillon aufgeführt. Nach der Anreicherung erfolgt ein Ausstrich auf mCCD-Agar (ISO, 2015). Ein Vergleich der beiden Anreicherungsmedien durch Baylis et al. (2000) zeigte, dass die Bolton-Bouillon hinsichtlich des Wachstums und des inhibitorischen Effektes gegenüber der Begleitflora in Lebensmittelproben den besseren Kompromiss bot (Baylis et al., 2000). In

Untersuchungen von Habib et al. (2011) wurden verschiedene Kombinationen von flüssigen und festen Nährmedien für den Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hähnchenfleisch verglichen. Hierbei zeigte die Anreicherung in Preston-Bouillon für 24 h eine höhere *Campylobacter*-Nachweisrate (20/49) als die Anreicherung in Bolton-Bouillon für 48 h (15/49), wenn die Kultur nach der Anreicherung auf mCCDA ausgestrichen wurde (Habib et al., 2011). Bei einem Vergleich von sechs verschiedenen festen Nährböden durch Gun-Munro et al. (1987) zeigten das mCCD-Agar und das Karmali-Agar die höchsten Isolierungsraten aus Fäkalproben. Auch die Unterdrückung der fäkalen Begleitflora war bei mCCD- und Karmali-Agar am stärksten (Gun-Munro et al., 1987).

Biochemische Tests zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* sind der Katalase-, der Hippurat-Hydrolyse- und der Indoxyl-Acetat-Test sowie die Resistenzbestimmung gegenüber Nalidixinsäure und Cefalotin. Die meisten *Campylobacter* zeigen eine positive Oxidase-Reaktion, während Zucker nicht verwertet werden kann (Hébert et al., 1982; Steinbrueckner et al., 1999). Ein Nachteil der Differenzierung von *Campylobacter* spp. mittels biochemischer Tests ist die variable Aktivität des Hippurathydrolyse-Enzyms bei einigen *C. jejuni*-Stämmen. Durch die Anwendung von PCR-basierten Nachweismethoden können auch solche *C. jejuni*-Stämme identifiziert werden, die keine Hippurathydrolyse synthetisieren (Steinbrueckner et al., 1999; Miljković -Selimović et al., 2014). Wang et al. (2002) entwickelten einen Multiplex-PCR-Assay zum gleichzeitigen Nachweis von fünf verschiedenen *Campylobacter*-Spezies. Zum Nachweis von *C. jejuni* wurden die Gene *hipO* und 23S rRNA verwendet. *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* wurden über das *glyA* Gen und *C. fetus* subsp. *fetus* über das *sapB2* Gen nachgewiesen (Wang et al., 2002).

Um genetische Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb einzelner *Campylobacter*-Spezies zu charakterisieren, können verschiedene Typisierungsverfahren angewandt werden. Die Vor- und Nachteile unterschiedlicher Genotypisierungsverfahren sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Vor- und Nachteile unterschiedlicher Genotypisierungsverfahren für die Typisierung von *Campylobacter* spp. nach Eberle und Kiess (2012)**

Typisierungsmethode	Vorteil	Nachteil
Flagellin-Typisierung	Diskriminierungsfähigkeit, Zeitaufwand	Ungenauigkeiten aufgrund genetischer Rekombination
Ribotypisierung	Typisierbarkeit	Diskriminierungsfähigkeit, Zeit- und Kostenaufwand
PFGE	Diskriminierungsfähigkeit	Kosten und Reproduzierbarkeit zwischen Laboratorien
MLST	Reproduzierbarkeit und Interpretation der Ergebnisse	Kosten und Komplexität der Methode
AFLP	Diskriminierungsfähigkeit, Reproduzierbarkeit, Typisierbarkeit	Komplexität der Methode, Verfälschung der Ergebnisse durch Fremd-DNA
PCR	Diskriminierungsfähigkeit, Reproduzierbarkeit,	Optimierung der Reaktionsbedingungen u. U. zeitaufwendig

PFGE=Pulsfeld-Gelelektrophorese, MLST=Multilocus-Sequence-Typing, AFLP=Amplified-Fragment-Lenght-Polymorphism, PCR=Polymerase Chain Reaction

#### 2.3.4 Vorkommen bei Masthähnchen und im Hähnchenfleisch

Die Prävalenz von *Campylobacter*-positiven Broilerherden nimmt in Ländern mit gemäßigttem Klima in den Sommermonaten zu (Nylen et al., 2002). Möglicherweise spielt dabei das vermehrte Auftreten von *Campylobacter* in der Umwelt, wie zum Beispiel in Wasserquellen, bei Insekten oder Wildvögeln, eine Rolle (Kapperud et al., 1992; Broman et al., 2002; Hald et al., 2008). Eine erhöhte Prävalenz wurde auch bei extensiv gehaltenen Broilerherden im Vergleich zur konventionellen Haltung nachgewiesen (Heuer et al., 2001; Allen et al., 2011). Vor allem ein höheres Alter von Broilern vor der Schlachtung ist als ein Risikofaktor für die Kolonisierung mit *Campylobacter* spp. identifiziert worden (Evans und Sayers, 2000; McDowell et al., 2008; Sommer et al., 2013). In der Regel kommt es zur Infektion einer Broilerherde im Alter von etwa zwei bis vier Wochen und zu einer raschen Ausbreitung der Infektion innerhalb einer Herde (Jacobs-Reitsma et al., 1995; Newell und Fearnley, 2003).

Die von der European Food Safety Authority (EFSA) gesammelten Daten zum Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Broilerherden und Hähnchenkarkassen zeigten große Unterschiede in der Prävalenz zwischen den verschiedenen EU-Mitgliedstaaten. Insgesamt waren im Jahr 2013 etwa 20 % der Proben bei Broilern und etwa 30 % aller getesteten Hähnchenfleischproben *Campylobacter* spp. positiv. Diese Daten werden jedoch dadurch beeinflusst, dass Länder mit niedriger *Campylobacter*-Prävalenz häufig mehr Proben untersuchten als Länder mit höherer Prävalenz (EFSA und ECDC, 2015). In Deutschland wurden im Rahmen des Zoonosenmonitorings im Jahr 2013 in 25,2 % der Blinddarmproben von Masthähnchen und in 52,3 % der Halshautproben im Schlachthof *Campylobacter* spp.

nachgewiesen, während 37,5 % des Hähnchenfleisches aus dem Einzelhandel belastet waren (BVL, 2015). Eine höhere Prävalenz bei beprobten Schlachtkörpern im Vergleich zu Blinddarmproben weist auf eine Kreuzkontamination mit *Campylobacter* spp. während der Schlachtung hin (Hue et al., 2010). Auch können vor der Schlachtung *Campylobacter*-negative Herden durch vorher geschlachtete positive Herden kontaminiert werden (Newell et al., 2001; Reich et al., 2008; Wieczorek et al., 2015). Allen et al. (2007) wiesen eine *Campylobacter*-Prävalenz von  $\leq 30$  % auf Karkassen von blinddarmnegativen Broilerherden nach, die direkt nach anderen blinddarmnegativen Herden geschlachtet wurden. Die Schlachtung von blinddarmpositiven Herden führte in mehreren Studien zu einem hohen Anteil von 90 bis 100 % kontaminierter Karkassen (Rosenquist et al., 2006; Allen et al., 2007; Reich et al., 2008; Seliwiorstow et al., 2015).

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. auf Schlachtkörpern wird von der Probenahmemethode beeinflusst. In Untersuchungen von Scherer (2007) wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Haut- und der Spülprobe bei Hähnchenschenkeln aus dem Handel nachgewiesen. Der Median in den Hautproben betrug 4,0 log KbE/Schenkel und in den Spülproben 4,3 log KbE/Schenkel. Ebenso geringe Unterschiede in den Keimzahlen zeigte das Spatelverfahren mit direktem Ausstreichen der Probe im Vergleich zu einer MPN-Methode mit Anreicherung (Scherer, 2007). In einer Studie von Jørgensen et al. (2002) wurden unterschiedliche Probenahmemethoden für den Nachweis von *Campylobacter* spp. in frischen Hähnchenkarkassen aus dem Einzelhandel verglichen. Dabei zeigte die Karkassenspülprobe eine ähnlich hohe *Campylobacter*-Nachweisrate wie die Nackenhautprobe. Die ermittelten Mittelwerte der *Campylobacter*-Keimzahlen lagen in der Spülprobe bei 4,9 log KbE/Karkasse und in der Nackenhautprobe bei 4,1 log KbE/Karkasse. Durch die Kombination des Spülens der ganzen Karkasse und des zusätzlichen Homogenisierens der Nackenhaut in der Spülflüssigkeit wurden die höchsten Keimzahlen von 5,1 log KbE/Karkasse ermittelt (Jørgensen et al., 2002).

Während der Schlachtung kann die Belastung der Schlachtkörper durch verschiedene Prozessschritte beeinflusst werden. So führte das Rupfen häufiger zu einer Zunahme der *Campylobacter*-Konzentration auf Hähnchenkarkassen, während das Brühen, Waschen und Kühlen zu Reduktionen führte (Rosenquist et al., 2006; Allen et al., 2007; Zweifel et al., 2015; Seliwiorstow et al., 2015). Studien, die die *Campylobacter*-Belastung von Broilerkarkassen in mehreren Schlachtbetrieben untersucht haben, konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Schlachtbetrieben, aber auch in Abhängigkeit von der geschlachteten Herde, feststellen (vgl. Tab. 5).

**Tabelle 5: Vorkommen von *Campylobacter* spp. während der Broilerschlachtung**

Keimzahlmittelwerte in log KbE/g bzw. log KbE/ml									
Referenz	BD	BW	B	R	E	W	K	Material	
Rosenquist et al. (2006)	6,96			2,75	3,23		2,54	Betrieb1/ Herde 1	
	6,65			1,90	2,40		1,43	Betrieb 1/ Herde 2	
	8,20			3,85	3,83		2,59	Betrieb 2/ Herde 4	
	7,72			3,93	3,93		3,24	Betrieb 2/ Herde 5	
Allen et al. (2007)		3,9		4,2	3,8		3,8	Betrieb 4/ Herde A	
	9,1			5,0	5,1		4,1	(1.-3. Charge)	
	8,7			7,3	6,5		6,2		
		3,1		6,8	5,4		4,3		Betrieb 4/ Herde B
		8,7		6,8	5,9		6,3	(1.-3. Charge)	
		9,6		7,8	6,4		6,7		
		4,4		5,0	5,9		5,7	Betrieb 1/ Herde M	
		6,3		5,3	4,6		2,6	Betrieb 3/ Herde G,H,J	
		7,9		5,5	6,1		5,5		
		6,6		6,9	6,2		6,2		
							5,9	5,8	Betrieb 4/ Herde O,P,G
							5,4	4,7	
							6,5	6,0	
						6,4	5,8	Betrieb 3/ Herde R,S,T,U,V	
						5,9	4,9		
						5,5	4,4		
						7,0	5,0		
						5,7	4,7/5,1		
Zweifel et al. (2015)		1,40- 2,30*	3,28	3,64	3,62	2,96	3,18	Betrieb A	
		2,00- 2,40*	2,33	2,65	2,54	2,72	2,54	Betrieb B	
		2,33	2,87	3,48	3,24	3,34	3,42	Betrieb C	
Seliworstow et al. (2015)	8,52- 9,59			3,18	3,63		3,12	Betrieb A	
	7,99- 9,28			3,76	4,28		3,26	Betrieb B	
	8,06- 9,71			3,58	3,86		3,43	Betrieb C	
	8,93- 9,71			2,98	3,40		2,69	Betrieb D	

BD=Blinddarmproben, BW=Brühwasserproben, Hautproben (B=nach Brühen, R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen), \*aufeinanderfolgende Brütanks

## 2.4 Bekämpfung von *Salmonella* und *Campylobacter*

Kontrollmaßnahmen zur Reduktion von *Salmonella* und *Campylobacter* umfassen die ganze Lebensmittelkette im Sinne des „From stable to table“-Konzeptes. Die Grundlage für die Bekämpfung in der EU bildet die Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern. Diese regelt Ziele und Maßnahmen für die Senkung der Prävalenz bestimmter Zoonosen auf allen Stufen der Lebensmittelkette. Für Salmonellen werden Mindestanforderungen für die Beprobung von Zucht- und Mastherden genannt. Außerdem wird geregelt, dass frisches Geflügelfleisch nur dann in den Verkehr gebracht werden darf, wenn Salmonellen in 25 g nicht vorhanden sind (Anonymous, 2003). Für *Campylobacter* hingegen existieren derzeit noch keine gesetzlich festgelegten Grenzwerte in Lebensmitteln (EFSA, 2011). Tabelle 6 gibt eine Übersicht über verschiedene Probenahmestellen für *Salmonella* spp. entlang der Lebensmittelkette in Verbindung mit den europäischen und nationalen Rechtsvorschriften.

**Tabelle 6: Probenahmestellen für *Salmonella* in der Hähnchenfleischproduktion und zugehörige Rechtsvorschriften (modifiziert nach Mead et al., 2010)**

Stufe der Lebensmittelkette	Probe	Rechtsvorschriften (EG, DE)
Futtermittelherstellung	Futtermittelzutaten Futtermühle (Umweltproben) Fertige Futtermittel	VO (EG) 2160/2003 GfSalmoV VO (EG) Nr. 183/2005
Zuchtherden: Brüterei	Schlupfbrüter- Hordenauskleidungen, Oberflächentupfer, zerbrochene Eischalen	VO (EG) 2160/2003 VO (EG) 200/2010 GfSalmoV
Haltung	Stiefelüberzieher, Staubproben, Kotproben	
Broilerherden	Stiefelüberzieher, Staubproben, Oberflächentupfen	VO (EG) 2160/2003 VO (EU) Nr. 200/2012 GfSalmoV
Broilerschlachtung/ Zerlegung/ Verarbeitung	Halshaut von Schlachtkörpern nach dem Kühlen, Haut-/Muskelprobe von Hühnerteilen	VO (EG) 2160/2003 VO (EG) Nr. 2073/2005
In Verkehr gebrachte Erzeugnisse	Hackfleisch/Faschiertes, Geflügelfleischzubereitungen, Frisches Geflügelfleisch	VO (EG) 2160/2003 VO (EG) Nr. 2073/2005

VO=Verordnung, EG=Europäische Gemeinschaft, DE=Deutschland, GfSalmoV=Geflügel-Salmonellen-Verordnung

### 2.4.1 Maßnahmen in der Primärproduktion

Die Kontrolle von *Salmonella* spp. sollte bereits in den Zuchtbetrieben und Brütereien erfolgen, da sowohl eine vertikale als auch eine horizontale Übertragung möglich ist (Bailey et al., 1994; Heyndrickx et al., 2002; Liljebjelke et al., 2005). Nach Infektion des Muttertieres können Salmonellen über die Fortpflanzungsorgane auf das Ei oder nach Eiablage über fäkale Kontamination und Penetration der Eischale übertragen werden (Gantois et al., 2009). Die infizierten Küken führen zu einer weiteren Verbreitung der Salmonellen in der Brüterei oder während der Mast (Cason et al., 1994; Heyndrickx et al., 2002).

Im Gegensatz zu Salmonellen spielt bei *Campylobacter* spp. die Kontamination über infizierte Elterntiere nur eine geringe Rolle. Zwar konnten *Campylobacter* spp. in den Fortpflanzungsorganen von Hennen nachgewiesen werden, allerdings ist unklar, ob dies zur Infektion der Embryonen führen kann (Camarda et al., 2000; Buhr et al., 2002; Newell und Fearnley, 2003). Auch für eine sekundäre, fäkale Übertragung von *Campylobacter* spp. in der Brüterei existieren bisher keine epidemiologischen Beweise (EFSA, 2011). Callicott et al. (2006) untersuchten etwa 60.000 Nachkommen von *Campylobacter*-positiven Großelterntieren. Bei keiner der Nachkommen, die unter Einhaltung strikter Biosicherheitsmaßnahmen aufwuchsen, konnten *Campylobacter* spp. in Kotproben nachgewiesen werden (Callicott et al., 2006). Somit gelten Eintagsküken am Tag des Schlüpfens als frei von *Campylobacter* spp. (Newell und Fearnley, 2003; Callicott et al., 2006).

Biosicherheitsmaßnahmen in der Primärproduktion dienen dazu, die Exposition von nicht-infizierten Tieren mit Krankheitserregern zu verhindern oder zu minimieren. Dabei können eine Vielzahl von belebten und unbelebten Vektoren zum Eintrag von Salmonellen oder *Campylobacter* in Masthähnchenherden führen. Für Salmonellen ist bekannt, dass Ungeziefer wie Fliegen, Käfer, Ratten oder Mäuse eine Vektor- und Reservoirfunktion haben können (Jones et al., 1991; Henzler und Opitz, 1992; Skov et al., 2004). Ergebnisse aus der Studie von Skov et al. (2004) deuteten darauf hin, dass Käfer trotz Anwendung des Rein-Raus-Prinzips als Vektoren zwischen zwei aufeinanderfolgend eingestellten Broilerherden dienten und zur Übertragung eines *S. Indiana*-Stammes führten. Hald et al. (2008) schätzten, dass etwa 6.500 Fliegen pro Mastdurchgang über die Lüftungsanlagen eines Stalles eingetragen wurden und fanden heraus, dass diese besonders in den warmen Sommermonaten mit *Campylobacter* spp. belastet sein können. In einer anderen Studie führte die Installation von Fliegengittern zu einer Senkung der *Campylobacter*-Prävalenz in Broilerherden (Hald et al., 2007). Vor allem Wasserquellen, kontaminierte Misthaufen oder Fäzes von Wildtieren außerhalb des Stalles können *Campylobacter* spp. enthalten (Herman et al., 2003). Da in einzelnen Broilerherden teilweise mehrere unterschiedliche

*Campylobacter*-Genotypen nachweisbar sind, müssen unterschiedliche Eintragsquellen berücksichtigt werden (Alter et al., 2011).

Auch der Mensch wird als Risikofaktor für den Eintrag von Salmonellen und *Campylobacter* in nicht-infizierte Herden angesehen. Dabei erhöht sich das Risiko mit der Anzahl an Personen, die sich um die Tiere kümmern, wie auch mit der Anzahl an Besuchern der Tierhaltung (Arsenault et al., 2007b; EFSA, 2011). Besonders häufig sind die Gummistiefel des Personals mit *Salmonella* (Marin et al., 2011) oder *Campylobacter* (Herman et al., 2003; Ramabu et al., 2004) kontaminiert. In der Geflügel-Salmonellen-Verordnung wird daher das Einrichten von Hygieneschleusen mit Stiefel- und Handwaschmöglichkeit vorgeschrieben (Anonymous, 2014).

Eine weitere Möglichkeit der Bekämpfung von *Salmonella* und *Campylobacter* in der Primärproduktion ist die Behandlung des Tränkewassers oder Futters. In einer Studie von Byrd et al. (2001) wurde nach der Zugabe von 0,44 %-iger Milchsäure mit dem Tränkewasser während des Futterentzugs eine Reduktion der Inzidenz von *Salmonella* und *Campylobacter* im Kropf der Broiler festgestellt. Zudem reduzierte sich die Prävalenz von *Salmonella* und *Campylobacter* auf den Karkassen nach der Schlachtung um 52,4 % bzw. 14,7 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Byrd et al., 2001). Kittler et al. (2013) untersuchten den Effekt der Bakteriophagenapplikation gegen *C. jejuni* bei *Campylobacter*-positiven Broilerherden. Hierbei zeigte sich eine *Campylobacter*-Reduktion von >3,2 KbE/g im Blinddarminhalt bei der Schlachtung (Kittler et al., 2013).

In der EU wurden mehrere Lebend- und inaktivierte Impfstoffe für die Vakzinierung von Geflügel gegen Salmonellen zugelassen (EFSA Panel on Biological Hazards, 2004). In Deutschland hat nach der Geflügel-Salmonellen-Verordnung der Besitzer eines Hühnerzuchtbetriebes mit mehr als 250 Tieren die Küken und Junghennen seines Bestandes gegen *Salmonella* Enteritidis mit einem für diesen Serotyp zugelassenen Impfstoff zu impfen oder impfen zu lassen. Zudem besteht Impfpflicht gegen *Salmonella* Typhimurium im Falle eines Verdachtes einer Infektion mit diesem Serotyp oder wenn im vorhergehenden Aufzuchtdurchgang eine Infektion festgestellt wurde (Anonymous, 2014). Ein Vorteil der Impfung von Broilerzuchtherden gegen Salmonellen wird darin gesehen, dass die Nachkommen durch das Übertragen von maternalen Antikörpern vor einer Infektion geschützt werden können (Si et al., 2014; Cony et al., 2015). Als Intervention gegen *Campylobacter* spp. konnte noch kein Impfstoff entwickelt werden, der effektiv die Kolonisierung bei Broilern reduzieren könnte (EFSA, 2011; Hermans et al., 2011).

Die strengen Hygienemaßnahmen in der Broilerproduktion führen dazu, dass Küken in den ersten Lebenstagen nur langsam eine Darmflora entwickeln können, die die Ansiedlung von

pathogenen Bakterien verhindern kann. Nurmi und Rantala (1973) haben gezeigt, dass die Verabreichung von Bakterien aus dem Kropf- und Darminhalt erwachsener Tiere an Küken diese vor einer Infektion mit Salmonellen schützen kann. Dieser als Competitive Exclusion (CE) bekannte Mechanismus wurde von verschiedenen Autoren auf die Wirksamkeit gegen eine Ansiedlung mit *Salmonella* oder *Campylobacter* untersucht. Besonders nach der Applikation von undefinierten CE-Kulturen konnte die Prävalenz von *Salmonella*-positiven Broilerherden und die Konzentration von *Salmonella* und *Campylobacter* im Blinddarm von Broilern gesenkt werden (Mead et al., 1996; Palmu und Camelin, 1997; Stern et al., 2001). Weitere Ansätze zur Bekämpfung von *Salmonella* und *Campylobacter* in der Primärproduktion ist die Verabreichung von Probiotika oder von Bakteriozinen, die einen hemmenden Effekt auf pathogene Bakterien ausüben können (Stern et al., 2006; Kim et al., 2015).

### 2.4.2 Maßnahmen vor der Schlachtung

Für den Transport zum Schlachthof werden Broiler entweder per Hand (Fängerkolonnen) oder maschinell eingefangen. Der Transport zum Schlachtbetrieb erfolgt üblicherweise in Transportkäfigen oder in Containersystemen bestehend aus mehreren Kompartimenten. Häufig wird zum Ende der Mastperiode hin bereits ein Teil der Tiere einer Herde zur Schlachtung abgeholt, damit die übrigen Tiere weiter an Gewicht zunehmen können (EFSA, 2011; Löhren, 2012). Dies kann das Risiko des Eintrags von *Salmonella* oder *Campylobacter* spp. in die Herde durch das Personal oder durch kontaminierte Transportkäfige erhöhen (Hald et al., 2001; Slader et al., 2002; Allen et al., 2008).

Ursache für die Kontamination von Transportkäfigen können die falsche Reinigung und Desinfektion sein, insbesondere wenn organische Reste nicht vollständig entfernt werden oder wenn Temperatur und Konzentration des Desinfektionsmittels zu gering waren (Corry et al., 2002). Slader et al. (2002) wiesen *Salmonella* und *Campylobacter* in Transportkäfigen bei Ankunft in den Mastbetrieb nach, obwohl die Transportkäfige zuvor im Schlachtbetrieb gewaschen worden waren. Nach dem Transport waren die Federn von vorher *Salmonella*- und *Campylobacter*-negativen Tieren kontaminiert. Teilweise wurden dieselben Serotypen auf den Transportkäfigen, auf den Federn der Tiere und auf den Karkassen nach der Schlachtung detektiert (Slader et al., 2002).

Mögliche Risikofaktoren für die Kontamination während des Transports und der Schlachtung wurden durch mehrere Studien untersucht (Heyndrickx et al., 2002; Arsenault et al., 2007a; Mainali et al., 2009). Arsenault et al. (2007a) zeigten, dass der positive Nachweis im Caecum der Schlachtcharge, das Wetter während des Transports und eine über vierstündige Wartezeit in Transportkisten vor der Schlachtung einen signifikanten Einfluss auf die

Prävalenz von *Salmonella*-kontaminierten Karkassen hatten. Auch für die Kontamination der Karkassen mit *Campylobacter* spp. spielte der Nachweis der Erreger im Caecum eine Rolle. Außerdem waren Schlachtchargen, die zum Ende der Woche hin geschlachtet wurden und bei denen über 20 % der Tiere Futter im *Jejunum* aufwiesen, mit einem höheren Anteil belastet (Arsenault et al., 2007a). Auch der Stress der Tiere während des Transports der Tiere zum Schlachthof kann die Ausscheidung von *Salmonella* und *Campylobacter* erhöhen (Mulder et al., 1995; Whyte et al., 2001). In der Studie von Mainali et al. (2009) wurden eine längere Transportdauer und eine längere Wartezeit vor der Schlachtung als Risikofaktoren für die Kontamination der Karkassen mit *Salmonella* spp. identifiziert. Heyndrickx et al. (2002) untersuchten bei 18 belgischen Broilerherden das Vorkommen von *Salmonella* spp. entlang der Lebensmittelkette von der Brüterei bis zur Schlachtung. Dabei waren die fäkale Verunreinigung der Transportkäfige und vor allem die Identität des Schlachtbetriebes die wichtigsten Risikofaktoren für die Kontamination während der Schlachtung (Heyndrickx et al., 2002).

Der Futterentzug vor der Schlachtung soll fäkale Kontaminationen vor und während der Schlachtung verhindern. In der Praxis werden Broiler meistens für etwa 8 bis 12 Stunden vor der Schlachtung nüchtern gehalten, sodass es zu einer teilweisen Entleerung des Magen-Darm-Trakts kommt. Nüchterungszeiten von mehr als 12 Stunden sind aus Tierschutzgründen in der EU nicht erlaubt und können möglicherweise durch zunehmend wässrigere Kotkonsistenzen die Kontaminationsgefahr vor und während der Schlachtung erhöhen (Warriss et al., 2004; EFSA, 2011). Untersuchungen haben gezeigt, dass ein über 12-stündiger Futterentzug zum Anstieg des pH-Wertes im Kropf und dadurch möglicherweise zu einer erhöhten Kolonisierung des Kropfes mit *Enterobacteriaceae* führt (Hinton et al., 2000). Zudem führt der Futterentzug zum vermehrten Kotpicken der Tiere, sodass die *Campylobacter*- und *Salmonella*-Belastung im Kropf ansteigen kann (Byrd et al., 1998; Corrier et al., 1999). Eine Ruptur des Kropfes während der Schlachtung kann in einigen Betrieben sogar häufiger vorkommen als eine Ruptur des Darms (Hargis et al., 1995).

In einer Studie von Northcutt et al. (2003a) wurde der Einfluss des Futterentzugs und des Schlachtalters auf die Kontamination von Broilerkarkassen vor dem Kühlen untersucht. Der Futterentzug zeigte eine signifikante Erhöhung der *Campylobacter*-Zahlen um etwa 0,6 log-Stufen auf den Karkassen von 56 Tage alten Broilern, aber nicht bei 42 und 49 Tage alten Broilern (Northcutt et al., 2003a).

### 2.4.3 Maßnahmen in der Schlachtung

Die EU-Verordnung (EG) Nr. 852/2004 über Lebensmittelhygiene verpflichtet jeden Lebensmittelunternehmer in der EU zur Herstellung von Lebensmitteln unter hygienisch einwandfreien Bedingungen. Hersteller können sich dabei an nationalen Leitlinien orientieren, die Empfehlungen für eine gute Hygienepraxis und die Anwendung der Grundsätze des HACCP geben (Anonymous, 2004). Nach einer Studie von Sampers et al. (2010) bewirken Unterschiede im Hygienemanagement zwischen verschiedenen Geflügelschlachtbetrieben auch Unterschiede bei allgemeinen Hygieneparametern sowie bei der Kontamination mit pathogenen Bakterien. Die Autoren deuteten jedoch darauf hin, dass selbst ein effektives Hygienemanagement ohne andere Interventionsmaßnahmen in der Geflügelfleischproduktion keine Pathogenfreiheit in Endprodukten garantieren kann (Sampers et al., 2010).

Mehrere Prozessschritte im Schlachtverlauf können direkt oder indirekt zur Kontamination der Karkassen mit pathogenen Bakterien führen. Besondere Gefahrenpunkte für die Kreuzkontamination der Karkassen mit *Campylobacter* und *Salmonella* spp. sind das Brühen und Entfedern, die Eviszeration und der Kühlvorgang (Bryan und Doyle, 1995; Mead et al., 2010). Bereits zu Beginn der Schlachtung sind Federn und Haut von Masthähnchen häufig kontaminiert (Kotula und Pandya, 1995; Seliwiorstow et al., 2015). Durch den Transport und während des Wartens im Schlachtbetrieb kann die äußere Kontamination mit *Salmonella* und *Campylobacter* erhöht werden (Whyte et al., 2001; Slader et al., 2002; Buncic et al., 2012). So kann es im Brühtank zur teilweisen Ablösung der Bakterien und zur Kreuzkontamination nachfolgender Karkassen über das kontaminierte Brühwasser kommen (Mulder et al., 1978; Cason und Hinton, 2006). Maßnahmen zur Kontrolle der Kontaminationsgefahr können das Brühen in mehreren aufeinanderfolgenden Brühtanks sowie der Betrieb des Brühtanks im Gegenstromprinzip bei konstanter Frischwasserzufuhr sein (Waldroup et al., 1993; Cason et al., 1999; Cason und Hinton 2006). Russell (2012) empfiehlt die Installation eines Bürstensystems vor dem Brühen, um fäkale Kontaminationen an Haut und Federn zu entfernen. So kann den Autoren zufolge der Eintrag fäkalen Materials in den Brühtank um ca. 90 % gesenkt werden (Russell, 2012).

Die Kontrolle der Belastung von Geflügelkarkassen mit *Campylobacter* und *Salmonella* spp. während des Brühprozesses durch Veränderung der Brühtemperatur ist nur bedingt möglich. In mehreren Studien konnte durch Erhöhung der Brühwassertemperatur eine Reduktion der *Campylobacter*- oder *Salmonella*-Zahlen auf Karkassen erreicht werden (Oosterom et al., 1983; Yang et al., 2001; Lehner, 2010). Jedoch können zu hohe Brühtemperaturen zu Epidermisveränderungen führen, die die Anhaftung von Bakterien an der Geflügelhaut begünstigen können (Kim et al., 1993; Slavik et al., 1995). Letztendlich hängt die Wahl der

Brühtemperatur auch von der Vermarktungsform des Geflügels ab. Die heutzutage verwendeten Brühtemperaturen befinden sich typischerweise zwischen 52 °C und 59 °C; je nachdem, ob das Endprodukt frisch und mit möglichst intakter Epidermis oder tiefgefroren vermarktet werden soll (EFSA, 2011).

Die während des Brühvorgangs gelockerten Federn werden im anschließenden Rupfprozess gelöst. Noch nicht hinreichend geklärt ist, welchen Einfluss kontaminierte Federn in der Kontamination der Geflügelkarkassen haben. Nde et al. (2007) konnten durch molekulare Subtypisierung einen Zusammenhang zwischen der *Salmonella*-Belastung der Federn von Puten und den Karkassen nach dem Rupfen zeigen. *Salmonella*-Serotypen mit ähnlichen PFGE-Profilen wurden auf den Federn der Karkassen vor und nach dem Rupfen sowie an den Rupffingern detektiert (Nde et al., 2007). In einer Studie von Cason et al. (2004) wurde der Einfluss von Federn und Federfollikeln auf die mikrobielle Belastung von Broilerkarkassen nach dem Entfedern untersucht. Dabei wurde eine Gruppe genetisch federloser Vögel mit einer befiederten Gruppe von Vögeln nach einer Rupfdauer von 30 bzw. 60 Sekunden verglichen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der aeroben mesophilen Keimzahl, der *Campylobacter*- und *E. coli*-Zahl zwischen den beiden Gruppen oder nach unterschiedlicher Rupfdauer festgestellt (Cason et al., 2004).

Nach Allen et al. (2003) könnte auch die Aerosolbildung während des Rupfens und die Art der Rupfmaschine die Möglichkeit von Kreuzkontaminationen beeinflussen. Die Autoren fanden heraus, dass der Großteil der Federn und Bakterien während der ersten zehn Sekunden des Rupfprozesses entfernt wurde. Dadurch wären zukünftige Kontrollmaßnahmen zu Beginn des Rupfprozesses am effektivsten. Sowohl *Salmonella* als auch *Campylobacter* spp. können auf den Rupffingern und in der Schlachthofumwelt trotz Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen überleben (Olsen et al., 2003; Rasschaert et al., 2007a; Peyrat et al., 2008). Um der Bildung von Biofilmen entgegenzuwirken, sollte die Rupfmaschine daher einfach zu reinigen sein und die Rupffinger sollten regelmäßig ausgetauscht werden – besonders dann, wenn sie geschädigt sind (Fries, 2002).

Durch die Anwendung von Kloakenstopfen kann der Austritt von Fäzes aus der Kloake während des Brüh- und Rupfprozesses verhindert werden. In Studien von Musgrove et al. (1997), Berrang et al. (2001) und Buhr et al. (2003) konnten so die *Campylobacter*-Belastungen auf Hähnchenkarkassen gesenkt werden. Allerdings ist die technische Durchführung kompliziert umzusetzen, sodass keine kommerziellen Anlagen verfügbar sind (EFSA, 2011). Fäkale Kontamination während der Schlachtung kann insbesondere auch dann stattfinden, wenn die Eviszerationsmaschinen den jeweiligen Tiergrößen nicht angepasst sind und es zu Schädigungen des Magen-Darm-Trakts kommt (Hue et

al., 2011a). Fehler während der Eviszeration können durch schlecht justierte Schlachtgeräte sowie durch variable oder krankheitsbedingt zu geringe Tiergrößen begünstigt werden (Russell, 2003; Rosenquist et al., 2006). Berrang et al. (2004) wiesen nach, dass bereits geringe Mengen von 5 mg Caecuminhalt zu einer signifikanten Erhöhung der *Campylobacter*-Zahl auf Broilerkarkassen führen kann. Die mit Caecuminhalt kontaminierten Karkassen wiesen eine mittlere Keimzahl von 3,3 log KbE an *Campylobacter* auf, während in der Vergleichsgruppe 2,6 log KbE nachgewiesen wurden (Berrang et al., 2004). Ebenso zeigten Untersuchungen von Boysen und Rosenquist (2009), dass visuell sichtbare, fäkale Verschmutzungen auf Karkassen zu einem *Campylobacter*-Konzentrationsanstieg von 0,9 log KbE/Karkasse führten. Durch das Verwenden von Eviszerationsmaschinen, welche die Eingeweide nach dem Ausnehmen vom Tierkörper gänzlich trennen und nicht am Schlachtkörper hängen lassen, können visuell sichtbare fäkale Kontaminationen reduziert werden (Russell und Walker, 1997).

Das Waschen der Karkassen dient der Entfernung von Schmutz, Blut, Federn und fäkalen Kontaminationen von den Karkassen (Fries, 2002). Die Effektivität des Waschvorgangs wird durch verschiedene Parameter, wie Wassertemperatur und -druck, Düsentyp sowie Verwendung von Dekontaminationsmitteln, beeinflusst (Keener et al., 2004). In mehreren Studien wird von einer Reduktion der *Campylobacter*- (Izat et al., 1988; Bashor et al., 2004; Smith et al., 2005a) oder *Salmonella*- (Wang et al., 1997; Yang et al., 1998; Northcutt et al., 2005) Belastung von Karkassen nach dem Waschen berichtet. Li et al. (2002) haben höhere *Campylobacter*-Reduktionen beim Sprühen von chloriertem Wasser im Vergleich zum Leitungswasser durch einen Innen-Außenwäscher gefunden. Auch schien die Wassertemperatur eine wichtige Rolle zu spielen: Das Waschen bei 55 und 60 °C hohen Wassertemperaturen führte zu 0,78 KbE/Karkasse höheren *Campylobacter*-Reduktionen als das Waschen mit 20 °C temperiertem Wasser. Laut Keener et al. (2004) kann die schlechte Effektivität vieler Innen- und Außen-Wäscher durch zu niedrige Wassertemperaturen entstehen. Kaltes Wasser senkt die Oberflächenspannung des Wassers nicht ausreichend (Keener et al., 2004).

Berrang und Bailey (2009) untersuchten die Effektivität von fünf separaten Waschsritten einer Schlachtlinie zur Reduktion der Belastung der Karkassen mit pathogenen Bakterien. Es stellte sich heraus, dass kein einzelner Waschschrift alleine zu einer signifikanten Reduktion von *Campylobacter* oder *Salmonella* führte. Der Schlachtprozess insgesamt reduzierte die Konzentration von *Campylobacter* spp. von 2,58 auf 1,15 KbE/ml und die Prävalenz von *Salmonella* von 80 % auf 24 % auf den Karkassen (Berrang und Bailey, 2009). In Untersuchungen von Lehner (2010) wurde festgestellt, dass die Abschaltung eines Zusatzaußenwäschers nach dem Rupfen zu einer Reduktion der *Campylobacter*-Belastung

führte. Die Autorin vermutete die Empfindlichkeit von *Campylobacter* gegenüber Trockenheit oder die bessere Verteilung und Einnistung der Bakterien in die Federfollikel durch das Wasser als Ursache (Lehner, 2010).

Das Kühlen nach der Eviszeration und nach dem letzten Waschen soll bakterielles Wachstum auf den Schlachtkörpern hemmen und zur Haltbarkeit des Hähnchenfleisches beitragen (EFSA, 2011). Bei der Wasserkühlung kann es zur direkten Kontamination und Kreuzkontamination zwischen den Karkassen mit *Salmonella* und *Campylobacter* spp. über das Kühlwasser kommen (Lillard et al., 1990; Smith et al., 2005b). In der Literatur wurden sowohl über Zunahmen als auch über Abnahmen der Anzahl an *Salmonella*-kontaminierten Karkassen nach der Wasserkühlung berichtet (Lillard et al., 1990; Cason et al., 1997; Jiménez et al., 2002). Möglicherweise kommt es gleichzeitig zur Reduktion von kontaminierten Karkassen und zu Zunahmen bei anfänglich unbelasteten Karkassen durch Kreuzkontamination (Smith et al., 2005b; Huezo et al., 2007). Auch bei der Luftkühlung können Kreuzkontaminationen stattfinden (Ellerbroek et al., 1997; Fries und Graw, 1999; Mead et al., 2000). Untersuchungen von Mead et al. (2000) mit einem *E.coli*-Markerorganismus haben gezeigt, dass das parallele Sprühen der Karkassen mit Chlorwasser während der Luftkühlung die Kreuzkontaminationsrate sogar erhöhen kann. Allerdings ist die Kreuzkontaminationsgefahr im Vergleich zu den vorherigen Prozessschritten gering (Mead et al., 2000).

Huezo et al. (2007) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Luft- und Wasserkühlung hinsichtlich der Reduktion der *Campylobacter*- und *Salmonella*-Prävalenzen oder -Konzentrationen feststellen. Luft- und Wasserkühlung reduzierten die *Campylobacter*-Konzentrationen um etwa 1,4 bzw. 1,0 log KbE/ml und die *Salmonella*-Konzentrationen um etwa 1,0 bzw. 0,6 log KbE/ml, wenn keine chemischen Dekontaminationsmittel zum Einsatz kamen (Huezo et al., 2007).

In den Studien von Zhang et al. (2011) und Berrang et al. (2008b) wurden um 0,41 log KbE/ml und um 0,59 log KbE/ml niedrigere *Campylobacter*-Zahlen auf den Karkassen nach der Wasserkühlung im Vergleich zur Luftkühlung festgestellt. Diese Untersuchungen decken sich mit der Aussage von James et al. (2006), der zufolge beide Kühlmethoden zu einer Reduktion von pathogenen Bakterien führen können. Höhere Keimzahlreduktionen könnten aber durch die Wasserkühlung erreicht werden, insbesondere wenn das Kühlwasser durch Chlor behandelt wird (James et al., 2006). Eine Dekontaminationsmittelbehandlung des Kühlwassers ist in der EU allerdings nicht erlaubt (EFSA, 2011). Andere zugelassene Kontrollmaßnahmen bei der Wasserkühlung können der Betrieb des Kühltanks im

Gegenstromprinzip und eine ausreichende Frischwasserzufuhr sein (Blood et al., 1974; Karolyi et al., 2003).

Bei der logistischen Schlachtung sollen Kreuzkontaminationen zwischen positiven und negativen Herden vermieden werden, indem positive Herden nach den negativen Herden geschlachtet werden. Viele Schlachtbetriebe benutzen die logistische Schlachtung zur Bekämpfung von *Salmonella* spp. Dazu werden Broilerherden zwei bis drei Wochen vor der Schlachtung durch Stiefelüberziehproben auf *Salmonella* spp. untersucht (EFSA, 2011).

Die Effektivität der logistischen Schlachtung bei der Reduktion von *Salmonella* spp. auf Broilerkarkassen ist abhängig von der korrekten Bestimmung des *Salmonella*-Status der Herde und von der Effizienz der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vor der Schlachtung (Rasschaert et al., 2007a; van Immerseel et al., 2009). In der Studie von Rasschaert et al. (2007a) war die Schlachtungsumgebung, insbesondere die Ketten, Förderbänder und die Rupfmaschine, schon vor Beginn der Schlachtung mit Salmonellen kontaminiert. Dieselben *Salmonella*-Stämme, die vorher in der Schlachtungsumgebung isoliert worden waren, wurden nachfolgend auf den Karkassen einer *Salmonella*-negativen Herde nachgewiesen. In einer anderen belgischen Studie konnte gezeigt werden, dass der Salmonellenbefund aus den Stiefelüberziehproben nicht immer mit dem *Salmonella*-Status der Herde bei der Schlachtung übereinstimmt. Andererseits wurde festgestellt, dass die Kontamination der Karkassen mit *Salmonella* eher wenig mit dem *Salmonella*-Status korrelierte, aber wahrscheinlich häufig durch Kreuzkontamination über die Schlachtgeräte zustande kam (Rasschaert et al., 2008). Mittels eines mathematischen Modells wurde geschätzt, dass die *Salmonella*-Prävalenz kontaminierter Herden um 9 % gesenkt werden könnte (Evers, 2004).

Einige Studien zeigen, dass auch die Prävalenz *Campylobacter*-kontaminierter Karkassen und Produkte durch die logistische Schlachtung effektiv gesenkt werden kann (Potturi-Venkata et al., 2007; Sasaki et al., 2012). Jedoch könnte die Effektivität der logistischen Schlachtung dadurch gemindert werden, dass nur wenige Karkassen negativer Herden durch vorher geschlachtete positive Herden kontaminiert werden und dass die quantitative Zunahme gering ist (Nauta et al., 2005; Johannessen et al., 2007). In quantitativen Risikobewertungen zeigte die logistische Schlachtung nur einen geringen Effekt auf die humane *Campylobacter*-Inzidenz, im Gegensatz zu Maßnahmen, die die Anzahl von *Campylobacter* spp. auf Karkassen senken könnten (Rosenquist et al., 2003; Nauta et al., 2009a).

Eine weitere Möglichkeit, um die von positiven Herden ausgehende Belastung des Hähnchenfleisches zu minimieren, ist das sogenannte Testing and Scheduling-Verfahren.

Dabei sollen nach Identifizierung von positiven Herden besondere Maßnahmen, wie zum Beispiel das Gefrieren des Hähnchenfleisches, eingeleitet werden (Nauta et al., 2009b; EFSA, 2011). Besonders die Reduktion von quantitativ stark belastetem Hähnchenfleisch könnte das Risiko der humanen *Campylobacteriose* minimieren (Nauta et al., 2009b). Daher wurde in einer niederländischen Studie der Effekt von Testing and Scheduling auf das Hähnchenfleisch aus Herden mit einer hohen *Campylobacter*-Konzentration evaluiert. Die Autoren fanden eine geringe Korrelation zwischen den *Campylobacter*-Zahlen im Caecum und auf dem Hähnchenfleisch und kamen zu dem Ergebnis, dass Testing and Scheduling aufgrund von Unklarheiten im Verhalten von *Campylobacter* spp. im Schlachtbetrieb und wegen des Fehlens von zuverlässigen und schnellen Nachweismethoden keine praktikable Kontrollmaßnahme ist. Das Testing and Scheduling ist aus Kostengründen nur für Länder mit niedriger *Campylobacter*-Prävalenz eine Option (Nauta et al., 2009b).

Maßnahmen zur Dekontamination von Hähnchenschlachtkörpern während oder nach der Schlachtung beinhalten physikalische und chemische Verfahren (Loretz et al., 2010). Physikalische Verfahren werden in einigen Ländern im Rahmen des Testing and Scheduling-Verfahrens angewandt. So werden in Island, Norwegen und Dänemark nachweislich *Campylobacter*-positive Herden nach der Schlachtung eingefroren oder hitzebehandelt (Sandberg et al., 2005; Rosenquist et al., 2006; Tustin et al., 2011). Das Einfrieren der Karkassen für drei Wochen kann zu einer *Campylobacter*-Reduktion von etwa 2 log-Stufen auf den Karkassen führen (Sandberg et al., 2005; Georgsson et al., 2006). Nach einer viermonatigen Einfrierzeit konnten *Campylobacter* spp. durch quantitative Kulturmethoden noch auf 80 % der untersuchten Karkassen nachgewiesen werden (Sandberg et al., 2005).

Weitere physikalische Dekontaminationsmaßnahmen sind die Behandlung mit heißem Wasser oder Wasserdampf. Das Eintauchen von Karkassen in 70 bis 85 °C heiße Wasserbäder kann die *Campylobacter*-Zahlen um ca. 1 bis 2 log-Stufen senken (Whyte et al., 2003; Purnell et al., 2004; Corry et al., 2007). James et al. (2007) untersuchten die Wirksamkeit der Heißwasserbehandlung und der Wasserdampfbehandlung in Kombination mit Kühlen und oberflächlichem Gefrieren der Karkassen. Die Kombination einer Heißwasserbehandlung mit 80 °C heißem Wasser für 20 Sekunden mit dem oberflächlichen Gefrieren erwies sich als effektivste Maßnahme und konnte die *Campylobacter jejuni*-Zahlen um 2,9 log KbE/cm<sup>2</sup> reduzieren. Die Wirksamkeit der Wasserdampfbehandlung und Heißwasserbehandlung wird auch von der Dauer der Behandlung beeinflusst. Die Behandlung mit 90 °C heißem Wasserdampf für 12 Sekunden führte in der Studie von Whyte et al. (2003) zu keinen signifikanten *Campylobacter*-Reduktionen, während eine Behandlungsdauer von 24 Sekunden die *Campylobacter*-Zahlen um 1,3 log KbE/g reduzierte. Längere Behandlungsdauer und höhere Temperaturen können jedoch vermehrt

zu Epidermisschäden und Farbveränderungen an den Karkassen führen (Whyte et al., 2003).

Ein Nachteil vieler physikalischer Dekontaminationsverfahren im Vergleich zu chemischen Verfahren sind die damit verbundenen höheren Kosten (Havelaar et al., 2007). Chemische Dekontaminationsmittel müssen nach der Verordnung (EG) 853/2004 auf ihre Sicherheit und Wirksamkeit geprüft werden, bevor sie in der EU zugelassen werden können. Eine Vielzahl von chemischen Dekontaminationsmitteln – häufig auf der Basis von organischen Säuren, Chlor- oder Phosphatverbindungen – wurde in Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht (Loretz et al., 2010; Purnell et al., 2014). Die Behandlung von künstlich oder natürlich kontaminierten Geflügelkarkassen mit Essig- oder Milchsäure, saurem Natriumchlorit oder Natriumphosphat führten zu Bakterienreduktionen von etwa 1,0 bis 2,2 log-Stufen (Loretz et al., 2010). Dabei ist die Effektivität der Behandlungen von der Konzentration des Dekontaminationsmittels und von der Art der Anwendung abhängig (Bolder, 2007).

### 3 Material

#### 3.1 Material für die Probenahme

Die Entnahme der einzelnen Proben erfolgte durch Verwendung der in Tabelle 7 aufgeführten Verbrauchsmaterialien. Zur Kühlung der Proben während des Transports zum Labor wurden die Proben in eine Kühlbox mit Kühlakkus gelegt.

**Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien für die Probenahme**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Artikelnummer
Einmalskalpelle	Martin, Tuttlingen (Art. Nr. 10-285-18)
Transporttupfer mit Cary Blair-Medium	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA (Art. Nr. 220097)
Kochlöffel, autoklaviert	Fackelmann, Hersbruck
Nitrilhandschuhe	Süd-Laborbedarf, Gauting
Stomacherbeutel mit Filter	VWR International, Darmstadt Darmstadt (Art.-Nr. 129-9868)
Zentrifugenröhrchen (steril, 100 ml)	BD Biosciences, Bedford/USA (Art. Nr. 352070)

#### 3.2 Material für die bakteriologischen Untersuchungen

##### 3.2.1 Referenzstämme

Die als Positiv- und Negativkontrollen verwendeten Referenzstämme stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig. In Tabelle 8 sind die verwendeten Referenzstämme aufgeführt.

**Tabelle 8: Verwendete Referenzstämme**

Spezies/Subspezies	Identifikation
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	DSM 4688
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	DSM 11375
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	DSM 9898

##### 3.2.2 Nährmedien

In Tabelle 9 sind alle bei den bakteriologischen Untersuchungen verwendeten Nährmedien aufgelistet. Die Nährmedien wurden nach Herstellerangaben gelagert und zubereitet. Alle Nährmedien wurden wenige Tage vor dem Verbrauch zubereitet. Zum vollständigen Lösen

und Erhitzen der Nährmedien wurde ein Dampftopf (Umformtechnik Merten & Storck, Drensteinfurt) verwendet.

**Tabelle 9: Verwendete Nährmedien**

Nährmedium	Zusammensetzung, Herstellerangaben
<i>Campylobacter</i> Selektivagar (mCCDA)	<i>Campylobacter</i> -Agar-Basis, blutfrei (Oxoid CM739); CCDA-Selektiv-Supplement (Oxoid SR 155)
Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar (Plate Count-Agar)	Plate-Count-Agar (Oxoid CM 325)
Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose (DHL)-Agar	DHL-Agar nach Sakazaki (Merck 1.11435)
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Gepuffertes Peptonwasser (SIFIN TN 1226)
Modified semisolid Rappaport Vassiliadis-(MSRV)-Nährboden	MSRV-Nährboden-Basis, modifiziert (Oxoid CM 910B); MSRV-Selektiv-Supplement (Novobiocin, Oxoid SR161)
Müller-Hinton-Blutagar (MHB)	Müller-Hinton Agar (Oxoid CM 337); 5 % steriles Schafsblut (Thermo Scientific SR51C)
Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Anreicherungsbouillon (MKTTn)	Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Anreicherungs-Bouillon-Basis (Oxoid CM 1048); Novobiocin-Selektiv-Supplement (Oxoid SR 181E); Jod-Jodkalium-Lösung (Merck 1.04761.0100/1.05043.0250)
Preston Bouillon (PB)	Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid CM 67); <i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement (Oxoid SR 117E); <i>Campylobacter</i> -Anreicherungs-Supplement (Oxoid SR 232E); Aseptisch lysiertes Pferdeblut (Oxoid SR 48C)
Rappaport-Vassiliadis (RV)-Bouillon	Rappaport-Vassiliadis-Anreicherungs-lösung (Oxoid CM 669)
Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar	XLD-Agar (Oxoid CM 469)

### 3.2.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte für die bakteriologischen Untersuchungen

Die für die Probenaufbereitung und die bakteriologischen Untersuchungen verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien und Geräte für die bakteriologischen Untersuchungen**

Verbrauchsmaterialien/Geräte	Hersteller, Artikelnummer
Anaerobierbeutel, Anaerocult® C	Merck, Darmstadt (Art. Nr. 1.16275)
Anaerobier-Töpfe (2,5 l)	Oxoid, Wesel (Art. Nr. AG0025A)
Impfösen aus Kunststoff (steril, 1 µl, 10 µl)	nerbe plus, Winsen/Luhe (Art. Nr. 09-401-5001/ 09-421-5065)

Fortsetzung Tabelle 10

Verbrauchsmaterialien/Geräte	Hersteller, Artikelnummer
Mikrotiterplatten (steril, 12-Well)	Orange Scientific, Braine-l'Alleud/Belgien (Art. Nr. 4430400)
Petrischalen (steril, 100 mm Ø)	Greiner Bio-One, Kremsmünster/Österreich (Art. Nr. 663 102)
Pipettierhelfer accu-jet®	Brand, Wertheim
Reagenzgläser (9 ml, 17 ml)	Schott-Duran, Mainz (Art. Nr. 26 135 12 / 26 130 16)
Stomacherbeutel mit Filter	VWR International, Darmstadt (Art.-Nr. 129-9868)
Autoklav FVA 2/ A1	Fedegari, München
Glaspipetten (1 ml, 10 ml)	Brand GmbH, Wertheim (Art. Nr. 27306 / 27713)
Waage MC1 LC520S	Sartorius, Göttingen
Spiralplattensystem Eddy Jet v. 1.22	IUL Instruments, Königswinter
Sterilisator	Binder, Tuttlingen
Stomacher 400	Seward Limited, Worthing/Großbritannien
Brutschrank Heraeus HeraCell	Kendro Laboratory Products, Langenselbold

### 3.3 Material für die molekularbiologischen Untersuchungen

#### 3.3.1 Primer

Die für den *Campylobacter*-Nachweis, *Salmonella*-Nachweis und für die Amplifikationskontrolle verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgeführt. Alle Primer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 11: Sequenzen und Referenzen für verwendete Primer-Systeme**

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Referenz
CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	<i>C. jejuni hipO</i>	Wang et al. (2002)
CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC	<i>C. jejuni hipO</i>	Wang et al. (2002)
CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	<i>C. coli glyA</i>	Wang et al. (2002)
CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG	<i>C. coli glyA</i>	Wang et al. (2002)
CISybF	TCTGCAAATTCAGATGAGAAAA	<i>C. lari cpn60</i>	Chaban et al. (2009)
CISybR	TTTTTCAGTATTTGTAATGAAATATGG	<i>C. lari cpn60</i>	Chaban et al. (2009)
139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	<i>Salmonella invA</i>	Rahn et al. (1992)
141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	<i>Salmonella invA</i>	Rahn et al. (1992)

Fortsetzung Tabelle 11

Primer	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Referenz
Hb10	ATTCCACACAACATACGAGCC	pUC 19	Gallien et al. (1997)
Hb11	GTTTCGCCACCTCTGACTTGA	pUC 19	Gallien et al. (1997)
FLA4F	GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC	<i>C. jejuni flaA</i>	Meinersmann et al. (1997)
FLA1728R	CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG	<i>C. jejuni flaA</i>	Meinersmann et al. (1997)
FLA242FU	CTATGGATGAGCAATT(AT)AAAAT	<i>flaA</i> SVR	Meinersmann et al. (1997)
FLA625RU	CAAG(AT)CCTGTTCC(AT)ACTGAAG	<i>flaA</i> SVR	Meinersmann et al. (1997)

### 3.3.2 Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen

Die für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendeten Geräte sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12: Geräte für die molekularbiologischen Untersuchungen**

Geräte	Firma
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Eppendorf-Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge Ministar silverline	VWR International, Darmstadt
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
PCR-Arbeitsstation	UVP, Upland/USA
PCR-Cycler C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München
Thermo-Inkubationsmischer Thriller	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Transilluminator mit Fotoeinheit	Biometra, Göttingen

### 3.3.3 Reagenzien und Chemikalien

In Tabelle 13 sind alle übrigen für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendeten Reagenzien und Chemikalien aufgelistet.

**Tabelle 13: Reagenzien und Chemikalien für die molekularbiologischen Untersuchungen**

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
10x Reaktionspuffer [15/20 mM MgCl <sub>2</sub> ]	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (Art. Nr. 01-1000)
Agarose LE	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf (Art.-Nr. 840004)
Chelex <sup>®</sup> 100 Resin	Bio-Rad Laboratories, München (Art.-Nr. 142-1253)

Fortsetzung Tabelle 13

---

<b>Reagenzien/Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (Art. Nr. 01-1000)
Ethidiumbromidlösung 1 %	AppliChem, Darmstadt (Art.-Nr. A1152,0025)
Ladepuffer	Biozym Scientific, Hessisch-Oldendorf (Art.-Nr. 830632)
Magnesiumchlorid (25 mM)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (Art. Nr. 01-1000)
PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Merck, Darmstadt (Art.-Nr. 524650-1EA)
PUC 19 Plasmid-DNA	Sigma-Aldrich, Saint Louis/USA (Artikel-Nr. D3404)
Taq-Polymerase (5 U/μl)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (Art. Nr. 01-1000)
GeneJET <sup>TM</sup> PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA (Art.-Nr. K0701)
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Merck, Darmstadt (Art. Nr. 574795-1L)

---

## 4 Methoden

### 4.1 Probenahme in zwei Broilerschlachtbetrieben

Die Probenahmen erfolgten innerhalb eines Zeitraums von etwa 15 Monaten zwischen August 2013 und November 2014 in zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben. Tabelle 14 fasst die technischen Merkmale der beiden Schlachtbetriebe zusammen. In beiden Betrieben war die Produktion überwiegend vertikal integriert. Betrieb B zeigte jedoch im Vergleich zu Betrieb A eine geringere Schlachtkapazität pro Tag (vgl. Tab. 14).

**Tabelle 14: Technische Merkmale der Schlachtbetriebe**

Technisches Merkmal	Betrieb A	Betrieb B
Schlachtgeschwindigkeit	>12 000 Broiler/h	>12 000 Broiler/h
Schlachtkapazität	>200 000 Broiler/d	>100 000 Broiler/d
Anzahl Schlachtbänder	2	1
Betäubung	Gas (CO <sub>2</sub> )	Gas (CO <sub>2</sub> )
Entblutung	Automatisch, Dauer: ca. 3 min	Automatisch, Dauer: ca. 3 min
Brühen	Temperatur: 53 °C, Ein-Tank, Gegenstromprinzip, Dauer: ca. 3–4 min	Temperatur: 53 °C, Ein-Tank Dauer: ca. 2 min 30 s
Rupfen	Vollgummirupffinger, Dauer: ca. 1 min	Vollgummirupffinger, Dauer: ca. 30 s
Zusatzaußenwäscher nach Rupfen	Ja	Nein
Eviszeration	Automatisch	Automatisch
Innen-Außenwäscher nach Eviszeration	Ja	Ja
Kühlung	Temperatur: -2/-2,5 °C Luft-Sprüh-Kühlung, Dauer: 170 min	Temperatur: -2,5 °C Luftkühlung, Dauer: 150 min

An neun unterschiedlichen Tagen wurden Proben während und nach der Schlachtung von insgesamt elf Broilerherden gezogen (vgl. Tab. 15). Bei vier Herden in Betrieb A (Herde A1, A2, A3 und A4) und bei vier Herden in Betrieb B (Herde B1, B2, B3 und B4) wurden die Proben an unterschiedlichen Tagen jeweils während bzw. nach der Schlachtung einer einzigen Herde entnommen. Bei einer Probenziehung in Betrieb B wurden jeweils drei am gleichen Tag hintereinander geschlachtete Herden (Herde B5, B6 und B7) beprobt. Alle beprobten Herden stammten von unterschiedlichen Mästern. Dabei wurde eine Herde als eine Gruppe von Broilern definiert, die im selben Stall gemästet und am gleichen Tag geschlachtet wurde.

Bei insgesamt sechs der während der Schlachtung beprobten Herden waren *Salmonella* spp. durch Kotuntersuchungen (Überziehschuhproben) bereits im Mastbetrieb nachgewiesen worden (positiver *Salmonella*-Status). Aufgrund der in den Betrieben praktizierten logistischen Schlachtung waren dies immer Herden, die vor der Reinigung und Desinfektion als letzte geschlachtet wurden. Für die übrigen Probenziehungen wurden ebenfalls Herden ausgewählt, die gegen Ende der Schlachtung, das heißt nach mehreren zuvor geschlachteten Herden, geschlachtet wurden. Details zu den beprobten Herden sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15: Details zu den beprobten Herden in Betrieb A und in Betrieb B**

Herden-ID	Betrieb	Schlacht-datum	Uhrzeit	Herden-größe	Schlacht-alter	<i>Salmonella</i> -Status
A1	A	2013-09	09:00	31.800	42	negativ
A2	A	2014-05	19:30	19.500	42	positiv
A3	A	2014-06	20:30	19.400	42	positiv
A4	A	2014-07	20:00	10.500	42	positiv
B1	B	2013-08	13:00	30.000	42	positiv
B2	B	2013-12	13:30	26.500	40	positiv
B3	B	2014-03	14:00	5.800	46	positiv
B4	B	2014-10	09:15	27.000	42	negativ
B5	B	2014-11	07:35	30.000	44	negativ
B6	B	2014-11	09:45	29.500	42	negativ
B7	B	2014-11	12:00	12.000	34	negativ

#### 4.1.1 Probenahmestellen

Bei den Probenahmen wurden Brühwasser-, Nackenhaut- und Blinddarmproben sowie Tupferproben von den Schlachtanlagen gezogen. Zwischen der Entnahme der einzelnen Proben wurden jeweils neue, saubere Nitrilhandschuhe angezogen.

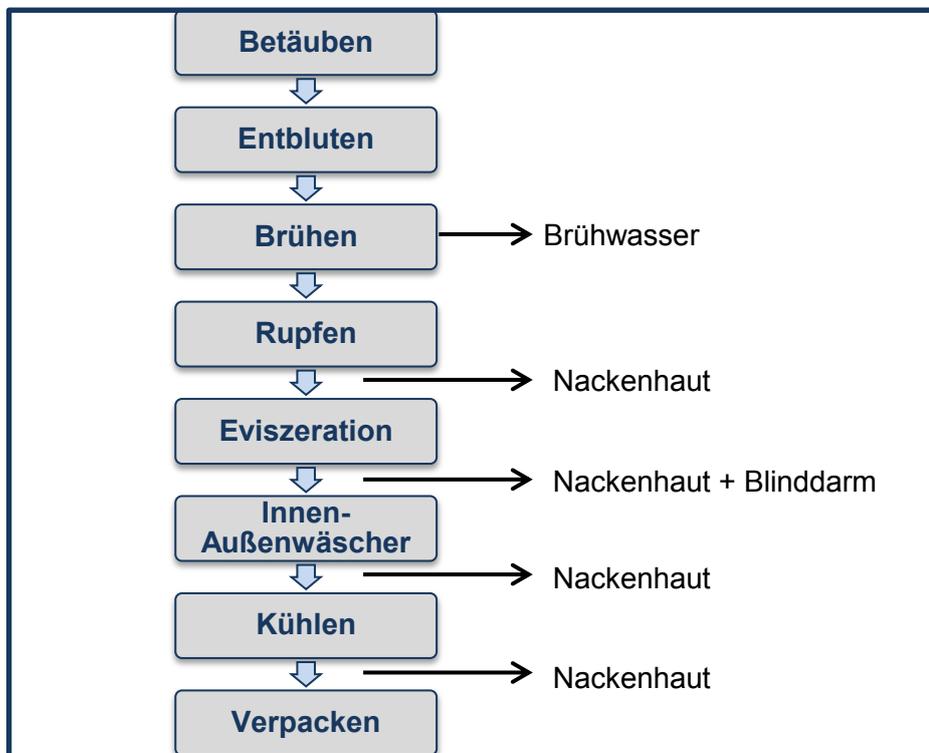
Die Entnahme von ca. 50 ml **Brühwasser** erfolgte etwa in der Mitte im Längsverlauf des Brühtanks. Das Brühwasser wurde nach dem Öffnen der seitlichen Tür des Brühtanks mit einem sterilen Kunststofflöffel entnommen und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt.

Die Entnahme der **Nackenhäute** erfolgte als Poolprobe: Jeweils drei Nackenhäute pro Probe wurden am laufenden Band abgeschnitten und in einen sterilen Stomacherbeutel überführt. Dabei wurden Nitrilhandschuhe und sterile Einmalskalpelle benutzt.

Die Nackenhautproben wurden an den folgend aufgeführten Positionen im Schlachtprozess entnommen:

- direkt nach dem Rupfen
- nach der Eviszeration bzw. direkt vor dem Innen-Außenwäscher
- direkt nach dem Innen-Außenwäscher
- nach dem Kühlen

Für die Untersuchung der **Blinddarmproben** wurden ganze Darmkonvolute nach der Eviszeration in der Bratfertiglienie entnommen. Die Proben wurden in sterile Stomacherbeutel überführt und unmittelbar gekühlt gelagert. Abbildung 6 stellt die Probenahmestellen für die Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben im Schlachtverlauf dar.



**Abbildung 6: Stationen der Broilerschlachtung mit Markierung der Probenahmestellen für die Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben (schwarze Pfeile)**

Die **Tupferproben** an den Schlachtgeräten wurden mittels steril verpackter Cary-Blair-Tupfer entnommen. Dazu wurde ein Tupfer pro Probe vor der Probenahme in BPW getränkt. Die Probenahme erfolgte durch mehrmaliges, kräftiges Hin- und Herwischen an den folgend aufgeführten Punkten:

- Rupffinger: Gesamte Fläche eines zufällig ausgewählten Rupffingers
- Kloakenschneider: Außenfläche einer zufällig ausgewählten Klinge
- Körperhöhlenöffner: Außenfläche einer zufällig ausgewählten Klinge
- Ausnehmer: Innenfläche einer zufällig ausgewählten Brustfixierplatte
- Nackenhautschneider: Außenfläche einer zufällig ausgewählten Klinge
- Vakuumsauger: Außenfläche einer zufällig ausgewählten Saugvorrichtung

Anschließend wurde der Tupfer in das fertige Cary-Blair-Medium eingeführt. Alle Proben wurden nach Entnahme in eine Kühlbox aus Styropor mit Kühlelementen gelegt und in dieser bis zum Untersuchungslabor transportiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte innerhalb von 36 h nach den Probenahmen.

Die Anzahl der gezogenen Proben ist in Tabelle 16 für Betrieb A und in Tabelle 17 für Betrieb B aufgeführt.

**Tabelle 16: Anzahl der gezogenen Proben in Betrieb A**

Probenart	Probenahmestelle	Probenzahl (n):			
		Herde A1	Herde A2	Herde A3	Herde A4
Blinddärme	Innereientrennung	5	5	5	5
Brühwasser	Brühtank	3	3	3	3
Nackenhäute (gepoolt)	nach Rupfen	5	5	5	5
	nach Eviszeration	5	5	5	5
	nach Wäscher	5	5	5	5
	nach Kühlung	5	5	5	5
Tupferproben	Rupffinger	-	-	6	6
	Kloakenschneider	-	-	6	6
	Körperhöhlenöffner	-	-	6	6
	Ausnehmer	-	-	6	6
	Nackenhautschneider	-	-	6	6
	Vakuumsauger	-	-	6	6

**Tabelle 17: Anzahl der gezogenen Proben in Betrieb B. Die graue Schattierung kennzeichnet die Probenziehung bei drei am gleichen Tag hintereinander geschlachteten Herden**

Probenart	Probenahmestelle	Probenzahl (n):						
		Herde B1	Herde B2	Herde B3	Herde B4	Herde B5	Herde B6	Herde B7
Blinddärme	Innereientrennung	5	5	5	5	5	5	5
Brühwasser	Brühtank	3	3	3	3	3	3	-
Nackenhäute (gepoolt)	nach Rupfen	5	5	5	5	-	-	-
	nach Eviszeration	5	5	5	5	5	10	10
	nach Wäscher	5	5	5	5	-	-	-
	nach Kühlung	5	5	5	5	-	-	-
Tupferproben	Rupffinger	-	-	-	6	-	-	6
	Kloakenschneider	-	-	-	6	-	-	6
	Körperhöhlenöffner	-	-	-	6	-	-	6
	Ausnehmer	-	-	-	6	-	-	6
	Nackenhautschneider	-	-	-	6	-	-	6
	Vakuumsauger	-	-	-	6	-	-	6

#### 4.1.2 Zeitlicher Ablauf der Probenahmen

Bei den acht Probenziehungen während der Schlachtung der Herden A1, A2, A3 und A4 in Betrieb A sowie der Herden B1, B2, B3 und B4 in Betrieb B war der Ablauf der Probenahme immer gleich. Das Ziel war es, den Einfluss verschiedener Prozessstufen auf die Kontamination der Schlachtkörper in Abhängigkeit vom Betrieb zu untersuchen. Die Proben wurden mindestens 10 Minuten nach Schlachtung des ersten Tieres der Herde entnommen, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Kontamination der Karkassen durch die Schlachtung möglicherweise positiver Herden stattfinden konnte. Zunächst wurden die Nackenhautproben nach der Eviszeration und nach dem Innen-Außenwäscher sowie die Blinddarmproben innerhalb von 15 Minuten gezogen. Dann erfolgte die Entnahme der Nackenhautproben nach dem Entfedern und der Brühwasserproben innerhalb der nächsten 15 Minuten im Bereich der Schlachtlinie. Die Nackenhautproben nach dem Kühlen wurden 10 Minuten nach Austritt des ersten Tieres der Herde aus der Kühlung entnommen. Insgesamt wurden je Herde und Probenahmestelle fünf gepoolte Nackenhautproben, drei Brühwasserproben oder fünf Blinddarmproben untersucht (vgl. Tab. 16 und Tab. 17).

Bei einer weiteren Probenziehung in Betrieb B wurden Proben während der Schlachtung von drei hintereinander geschlachteten Herden (Herde B5, B6 und B7) gezogen. Das Ziel war es, die Kreuzkontamination zwischen den Herden – besonders zu Beginn der

Schlachtung einer Herde – durch die vorangegangene Herde zu untersuchen. Bei allen drei Herden wurden je fünf Blinddarmproben entnommen. Bei der als erstes geschlachteten Herde (Herde B5) wurden etwa 10 Minuten vor Einlauf der nächsten Herde (Herde B6) fünf Nackenhaut-Poolproben nach der Eviszeration sowie drei Brühwasserproben entnommen. Die Beprobung der Herde 10 erfolgte durch Entnahme von je fünf Nackenhaut-Poolproben nach der Eviszeration in den ersten 5 Minuten nach Einlauf der Herde sowie zwischen Minute 10 und Minute 15 nach Einlauf der Herde. Zusätzlich wurden etwa 10 Minuten vor Einlauf der nächsten Herde (Herde B7) drei Brühwasserproben entnommen. Die Entnahme der Nackenhaut-Poolproben bei der Herde B7 erfolgte wie bei Herde B6.

Bei vier Probenziehungen wurden zusätzlich Tupferproben von den Schlachtanlagen vor der Reinigung und Desinfektion entnommen. Die Tupferprobenahme erfolgte nach Schlachtung der Herden A3, A4, B4 und B7 (vgl. Tab. 16 und Tab. 17).

### **4.2 Probenvorbereitung**

Die Aufbereitung der Proben zur Bestimmung der Keimzahlen erfolgte durch Herstellung einer Erstverdünnung, indem die Probe in der neunfachen Menge gepufferten Peptonwassers (BPW) bzw. in der achtfachen Menge Preston-Bouillons homogenisiert wurde.

#### **4.2.1 Aufbereitung der Brühwasserproben**

Die Brühwasserproben in den Zentrifugenröhrchen wurden direkt vor der Entnahme mit einem Vortexmischer durchmischt. Anschließend wurden 27 ml des Brühwassers in einen Stomacherbeutel mit 243 ml BPW überführt und die Probe eine Minute lang im Stomacher gemischt. Die so hergestellte Erstverdünnung wurde für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl, Anzahl an *Enterobacteriaceae* und *Salmonella* spp. weiterverwendet. Für den Nachweis von *Campylobacter* spp. wurden 1,5 ml Brühwasser aus den Zentrifugenröhrchen direkt in ein Reagenzglas mit 12,0 ml Preston-Bouillon pipettiert und der Inhalt des Reagenzglases vor der weiteren Untersuchung mit einem Vortexer durchmischt.

#### **4.2.2 Aufbereitung der Nackenhautproben**

Bei den Nackenhautproben wurde das Gewicht der Poolprobe kontrolliert und gegebenenfalls auf 27 g Haut korrigiert. Dazu wurde mit steriler Schere und Pinzette ein Stück Haut aus der Poolprobe entfernt oder von einer anderen Nackenhaut-Poolprobe aus derselben Entnahmestelle hinzugefügt. Die Herstellung der Erstverdünnung erfolgte durch Zugabe von 243 ml BPW zu der gepoolten Nackenhautprobe mit 27 g Haut. Die Probe wurde anschließend eine Minute lang im Stomacher homogenisiert. Das Homogenat wurde für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl, Anzahl an *Enterobacteriaceae* und

*Salmonella* spp. weiterverwendet. Die Erstverdünnung für den *Campylobacter*-Nachweis wurde durch Pipettieren von 1,5 ml des Haut-Peptonwasser-Gemisches in ein Reagenzglas mit 12,0 ml Preston-Bouillon hergestellt. Das Reagenzglas mit der Erstverdünnung wurde vor der weiteren Untersuchung mit einem Vortexer gemischt.

### 4.2.3 Aufbereitung der Blinddarmproben

Für die Aufbereitung der Blinddarmproben wurden zunächst die beiden Blinddärme eines Tieres mit steriler Pinzette und sterilem Skalpell vom übrigen Gastrointestinaltrakt abgetrennt. Danach wurde das abgetrennte Ende des Blinddarms mit einer sterilen Pinzette ergriffen und die Oberfläche des intakten Endes mit einem Papiertuch mit 70 %igem Ethanol befeuchtet. Das blinde Ende wurde dann kurz über einen Bunsenbrenner gehalten, um die Keime nur an der Oberfläche des Blinddarms abzutöten. Anschließend wurde das blinde Ende des Blinddarms mit einer sterilen Schere abgeschnitten und es wurden 1,5 g Blinddarminhalt in einen sterilen Stomacherbeutel abgedrückt.

Jeweils der Inhalt eines Blinddarms pro Probe wurde für die Untersuchung auf *Salmonella* spp. verwendet. Dazu wurden 13,5 ml BPW zu den 1,5 g Blinddarminhalt gegeben und die Probe eine Minute lang im Stomacher gemischt, um die Erstverdünnung herzustellen. Der Inhalt des zweiten Blinddarms desselben Tieres wurde für die Untersuchung auf *Campylobacter* spp. verwendet, indem zur Herstellung der Erstverdünnung 12,0 ml Preston-Bouillon mit 1,5 g Blinddarminhalt im Stomacher homogenisiert wurden.

### 4.2.4 Aufbereitung der Tupferproben

Die Tupfer für den qualitativen Nachweis von *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. wurden in 10 ml BPW bzw. 10 ml Preston-Bouillon mittels eines Vortexmischers durchmischt.

## 4.3 Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl der Brühwasser- und Nackenhautproben erfolgte mittels der sogenannten Spiralplattenmethode. Zunächst wurde eine Dezimalverdünnungsreihe aus den Erstverdünnungen (vgl. Kap. 4.2) hergestellt. Insgesamt 100 µl der Erstverdünnung ( $10^{-1}$ -Verdünnung) sowie 100 µl aus der  $10^{-3}$ -Verdünnung wurden dann mittels eines Spiral-Platers logarithmisch auf Plate Count (PC)-Agar aufgetragen. Somit konnten Keimzahlen zwischen  $1 \times 10^2$  bis  $2,1 \times 10^8$  KbE/ml durch Auszählen der Kolonien auf einer der beiden PC-Agar-Platten nachfolgend ausgewertet werden.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 30 °C wurden die Kolonien mithilfe einer Auszählanschablone gezählt. Die verschiedenen Regionen der Schablone markierten jeweils Bereiche mit bekannten konstanten Probenvolumina, die durch den Spiral-Plater aufgetragen

worden waren (vgl. Tab. 18). Es wurden mindestens 20 Kolonien von zwei gegenüberliegenden Segmenten der Schablone gezählt. Zur Berechnung der Keimzahl in KbE/ml wurde die Gesamtkoloniezahl der beiden Segmente durch das aufgetragene Probenvolumen in den ausgezählten Regionen geteilt. Dazu wurde das entsprechende Probenvolumen laut Tabelle 18 durch den Faktor 4 geteilt, da der gezählte Bereich der Schablone ein Viertel der gesamten Schablone ausmachte. Waren weniger als 20 Kolonien auf der Agar-Platte enthalten, wurden alle Kolonien ausgezählt und die Gesamtkolonienzahl durch das aufgetragene Gesamtvolumen von 100 µl geteilt, um die Keimzahl in KbE/ml zu erhalten. Zusätzlich wurde der ermittelte Wert an KbE/ml der Verdünnung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Anzahl an KbE/ml an der unverdünnten Probe zu bestimmen.

**Tabelle 18: Aufgetragene Probenvolumina für das Programm „Log Mode 100 µl“ des verwendeten Spiral-Plater-Systems (IUL Instruments GmbH, Königswinter, Benutzerhandbuch Eddy Jet, 2001)**

Region	Probenvolumen (µl)
3c	4,32
3c+3b	10,80
3c+3b+3a	21,12
3+4c	36,40
3+4c+4b	60,00
3+4c+4b+4a	98,40

#### 4.4 Bestimmung der Anzahl an *Enterobacteriaceae*

Die Bestimmung der Anzahl an *Enterobacteriaceae* in den Brühwasser- und Nackenhautproben erfolgte mittels der Spiralplattenmethode. Insgesamt 100 µl der Erstverdünnung sowie 100 µl aus der 10<sup>-3</sup>-Verdünnung wurden durch den Spiral-Plater logarithmisch auf Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose (DHL)-Agar-Platten aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 37 °C. Die Auszählung der Kolonien und die Berechnung der KbE/ml erfolgten nach dem in Kapitel 4.3 beschriebenen Verfahren.

#### 4.5 Mini-MPN-Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von *Salmonella* spp.

##### 4.5.1 Nicht-selektive Anreicherung im Mini-MPN

Der Nachweis von *Salmonella* spp. in den Brühwasser-, Nackenhaut- und Blinddarmproben erfolgte mittels eines Mini-MPN-Verfahrens in Anlehnung an die Methode ISO/TS 6579-2:2012 (E). Für die nicht-selektive Anreicherung in BPW wurde eine Verdünnungsreihe in Dreifachansatz hergestellt, indem jeweils 2,5 ml der Erstverdünnungen (vgl. Kap. 4.2) in die drei ersten, leeren Kavitäten einer 12-Well-Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Danach wurden je 0,5 ml aus den Kavitäten der ersten Spalte in 2 ml BPW der jeweils folgenden Kavitäten der zweiten Spalte pipettiert. Zwei weitere Verdünnungsschritte wurden in der gleichen Weise hergestellt, wobei die Suspension vor dem Transfer der 0,5 ml durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen gemischt wurde. Die in den 12-Well-Mikrotiterplatten verdünnten Proben wurden zusammen mit dem Rest der Erstverdünnungen in den Stomacherbeuteln 18 h bei 37 °C bebrütet.

##### 4.5.2 PCR-Screening auf *Salmonella* spp.

Nach der nicht-selektiven Voranreicherung wurden alle Ansätze der Brühwasser-, Nackenhaut- und Blinddarmproben in den Stomacherbeuteln mittels PCR auf *Salmonella* spp. überprüft. *Salmonella*-positive Proben wurden selektiv im Mini-MPN angereichert (vgl. Kap. 4.5.3). Für die PCR wurde zunächst eine DNA-Aufreinigung in Anlehnung an das Verfahren nach De Medici et al. (2003) mit den folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

- 1) 1 ml Anreicherung 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugieren
  - 2) Überstand verwerfen
  - 3) Sediment in 300 µl PBS-Puffer resuspendieren
  - 4) 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugieren
  - 5) Sediment in 300 µl *A. bidest* resuspendieren
  - 6) Zellsuspension bei 100 °C 15 Minuten im Heizbad kochen
  - 7) Sofort auf Eis stellen
  - 8) 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugieren
  - 9) Überstand als PCR-Template einsetzen
-  2 x wiederholen

Für den PCR-Nachweis des *invA*-Gens von *Salmonella* spp. nach Rahn et al. (1992) wurden die Primer 139 und 141 verwendet. Die Herstellung des PCR-Reaktionsansatzes (Mastermix) und die Auswahl des Cycler-Programms erfolgten wie in Tabelle 19 und Tabelle

20 beschrieben. Als Positiv- und Negativkontrolle wurde die DNA der in Kapitel 3.2.1 aufgeführten *Salmonella*- bzw. *Campylobacter*-Referenzstämme verwendet.

**Tabelle 19: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern 139 und 141 für den Nachweis von *Salmonella* spp. (Rahn et al., 1992)**

Komponente	Volumen/Ansatz
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,25 µl
Primer 139 [10 pm/µl]	0,375 µl
Primer 141 [10 pm/µl]	0,375 µl
Proben-DNA/Kontroll-DNA	2,0 µl
<i>A. bidest.</i>	19,0 µl
Σ	25,0 µl

**Tabelle 20: Cycler-Programm für die Amplifikation des *invA*-Gens für den Nachweis von *Salmonella* spp. (Rahn et al., 1992)**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	90 °C	70 s
Annealing	60 °C	100 s
Elongation	72 °C	102 s
Abschließende Elongation	72 °C	7 min

Die aufgereinigte DNA wurde zusätzlich in einer zweiten PCR-Reaktion für eine externe Amplifikationskontrolle verwendet, um falsch negative Ergebnisse der *invA*-PCR durch mögliche Inhibitoren in der extrahierten DNA auszuschließen. Dafür wurden die Primer Hb10 und Hb11 zur Amplifikation der pUC 19-DNA verwendet (Gallien et al., 1997). Das Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes und die Einstellungen des Cycler-Programms für die Amplifikationskontrolle sind in Tabelle 21 bzw. Tabelle 22 aufgeführt.

**Tabelle 21: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern Hb 10 und Hb 11 für den externen PCR-Standard (Gallien et al., 1997)**

Komponente	Volumen/Ansatz
10x Reaktionspuffer [15 mM MgCl <sub>2</sub> ]	3,13 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl
HB 10 [0,1 nm/µl]	0,1 µl
HB11 [0,1 nm/µl]	0,1 µl
pUC 19-DNA	1,0 µl
<i>A. bidest.</i>	18,97 µl
Proben-DNA	1,0 µl
Σ	25,0 µl

**Tabelle 22: Cycler-Programm für die Amplifikation der pUC 19-DNA (externer PCR-Standard) (Gallien et al., 1997)**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	65 °C	30 s
Elongation	72 °C	60 s
Abschließende Elongation	72 °C	7 min

Die anschließende Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate erfolgte in einer Gelkammer mit 2 %igem Agarosel und 1x TBE-Puffer. Nach Zupipettieren von jeweils 2 µl Ladepuffer zu den Amplifikaten wurden jeweils 10 µl des Gemisches in die Taschen des Agarosegels pipettiert, wobei die erste Tasche des Agarosegels für einen Längenstandard verwendet wurde. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei 125 V für 45 Minuten.

Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel für ca. 10 Minuten in 1 %iger Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach ca. 10 Minuten in *A. bidest.* gespült. Anschließend wurde das Gel in einen UV-Transilluminator gelegt, um die aufgetrennten DNA-Fragmente als fluoreszierende Banden sichtbar zu machen. Das Bild der Banden wurde über eine Videokamera an einen PC übertragen und ausgewertet. Als positiv wurden die Proben gewertet, bei denen eine Bande bei 284 bp (*invA*-Gen) bzw. 2686 bp (pUC 19-DNA) sichtbar wurde. Bei positivem Ergebnis der *invA*-PCR wurde eine selektive Anreicherung im Mini-MPN durchgeführt. Falls die Amplifikationskontrolle einer Probe in der

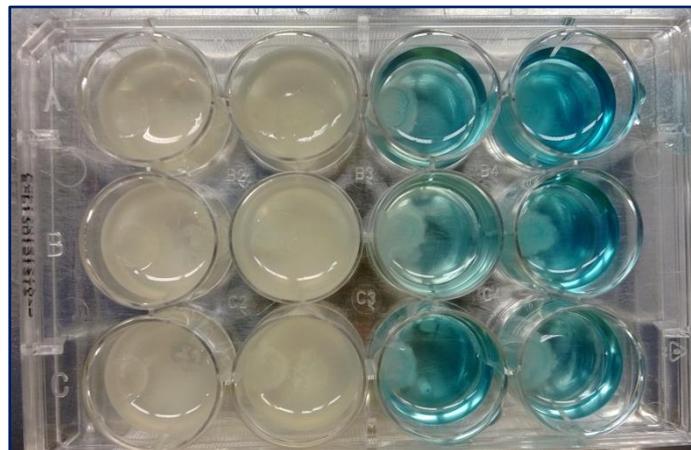
PCR negativ ausfiel, wurde für diese Probe unabhängig vom Ergebnis der *invA*-PCR eine selektive Anreicherung durchgeführt.

#### 4.5.3 Selektive Anreicherung im Mini-MPN-Verfahren

Die selektive Anreicherung erfolgte in 12-Well-Mikrotiterplatten mit jeweils 2 ml MSR-V-Medium pro Kavität. Insgesamt 20 µl Flüssigkeit wurden aus jeder Kavität der nicht-selektiven Anreicherung oberflächlich an den linken Rand des jeweils korrespondierenden Wells einer 12-Well-Mikrotiterplatte mit MSR-V-Medium transferiert. Zusätzlich wurde eine MSR-V-Petrischale mit drei Tropfen (insgesamt etwa 100 µl) der angereicherten Erstverdünnung aus dem Stomacherbeutel inokuliert. Die beimpften MSR-V-Medien wurden 24 bis 48 h bei 41,5 °C inkubiert.

#### 4.5.4 Bestätigung verdächtiger, positiver Ansätze mittels PCR

Nach der Inkubation zeigten die verdächtigen positiven MSR-V-Ansätze eine grauweiße, vom inokulierten Tropfen ausgehende Trübungszone (vgl. Abb. 7). Zur PCR-Bestätigung wurden alle Ansätze einer Verdünnungsstufe mit mindestens einer verdächtigen Kavität ausgewählt. Falls alle Kavitäten nach visueller Beurteilung negativ waren, wurden die MSR-V-Petrischale und alle Kavitäten der ersten Verdünnungsstufe der 12-Well-Platten für die PCR-Bestätigung herangezogen.



**Abbildung 7: MSR-V-Ansätze mit *Salmonella*-verdächtigen Kavitäten (6 x links) und nicht verdächtigen Kavitäten (6 x rechts) nach 48 h Inkubation bei 41,5 °C**

Für den Nachweis von *Salmonella* spp. mittels PCR wurde mit einer 10 µl Impföse Bakterienmaterial aus dem Rand der Trübungszone entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, das zuvor mit 300 µl TE befüllt wurde, überführt. Anschließend erfolgte eine DNA-Extraktion der Probe für 10 Minuten bei 99 °C. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde die DNA wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben mittels PCR amplifiziert und anschließend visuell sichtbar gemacht.

Zur Isolierung von *Salmonella* spp. auf XLD-Agar wurde die höchste Verdünnung mit positivem PCR-Ergebnis aus den MSRV-Anreicherungen verwendet. Dazu wurde Bakterienmaterial aus dem Rand der Trübungszone der MSRV-Anreicherung entnommen und mittels eines Dreiösenausstrichs auf raumtemperiertes XLD-Agar ausgestrichen. Die Inkubation der XLD-Agar-Platten erfolgte für 24 h bei 37 °C. Insgesamt fünf einzelne, schwarze Kolonien pro XLD-Agar-Platte wurden für die anschließende PCR-Bestätigung abgepickt. Nach einer zehnmütigen Kochlyse in 100 µl *A. bideest* bei 99 °C wurde eine PCR wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben durchgeführt. Von jeder in der PCR-positiven Probe wurden drei bis fünf Kolonien mittels eines Cary-Blair-Transporttupfers abgepickt und an das Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin zur Serotypisierung und zur Makrorestriktionsanalyse mittels PFGE verschickt.

#### 4.5.5 Bestimmung des MPN-Wertes für *Salmonella* spp.

Die Bestimmung des Most Probable Number (MPN)-Wertes erfolgte mithilfe einer frei verfügbaren Software aus dem Internet (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>). Die Anzahl an positiv bestätigten Kavitäten pro Verdünnungsstufe (vgl. Kap. 4.5.4) und die Menge an Probe in der jeweiligen Anreicherung (vgl. Tab. 23) wurden in eine Software-Tabelle eingetragen, um den MPN-Wert zu berechnen. Das Ergebnis der als positiv bestätigten Erstverdünnung wurde zur MPN-Berechnung mit einbezogen, falls alle Kavitäten der 12-Well-Mikrotiterplatten negativ waren.

**Tabelle 23: Probeneinwaagen für die MPN-Berechnung für *Salmonella* spp.**

	Anreicherungs-volumen	Probeneinwaage
Erstverdünnung	257,0 ml (Nackenhaut-/Brühwasserproben)	25,7 g/ml (Nackenhaut-/Brühwasserproben)
	7,5 ml (Blinddarmproben)	0,75 g (Blinddarmproben)
Erste Reihe der 3 Kavitäten	2,0 ml	0,20 g/ml
Zweite Reihe der 3 Kavitäten	2,0 ml	0,04 g/ml
Dritte Reihe der 3 Kavitäten	2,0 ml	0,008 g/ml
Vierte Reihe der 3 Kavitäten	2,0 ml	0,002 g/ml

#### 4.6 Nachweis von *Salmonella* spp. in den Tupferproben

Der qualitative Nachweis von *Salmonella* spp. in den Tupferproben erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 6579:2007. Zunächst wurde eine nicht-selektive Voranreicherung der Tupfer in 10 ml BPW bei 37 °C für 24 h durchgeführt. Für die anschließende selektive Anreicherung wurde 1 ml der Voranreicherung in 10 ml MKTTn-Bouillon und 0,1 ml der Voranreicherung in 10 ml RV-Bouillon pipettiert. Die Inkubation in MKTTn-Bouillon erfolgte für 24 h bei 42 °C

bzw. in RV-Bouillon für 24 h bei 37 °C. Für die Identifizierung von *Salmonella* spp. wurden die selektiven Anreicherungen auf XLD-Agar ausgestrichen und die Agarplatten für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die Bestätigung verdächtiger Kolonien mittels PCR erfolgte wie in Kapitel 4.5 beschrieben.

### 4.7 Typisierung der *Salmonella*-Isolate

Die Typisierung von *Salmonella* spp. wurde im nationalen Referenzlaboratorium für *Salmonella* des Bundesinstituts für Risikobewertung durchgeführt.

Die Serotypisierung der *Salmonella*-Isolate erfolgte serologisch durch Charakterisierung der O-Antigene (Oberflächenantigene) sowie der H1- und H2-Antigene (Flagellenantigene) anhand der Agglutination mit spezifischen Antikörpern. Es erfolgte eine Zuordnung der Isolate anhand des jeweils aktuellen White-Kauffmann-Le-Minor-Schemas (Guibourdenche et al., 2010; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Zusätzlich wurde eine Makrorestriktionsanalyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) gemäß dem standardisierten PulseNet-Protokoll für die Feintypisierung von *Escherichia coli* und *Salmonella* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt (CDC, 2013). Dadurch konnten klonale Zusammenhänge von *Salmonella*-Isolaten aus unterschiedlichen Probenarten und von unterschiedlichen Probenahmestellen identifiziert werden.

Für die PFGE im Agarosegel wurde das Restriktionsenzym *Xba*I verwendet, um die bakterielle DNA in Fragmente aufzuspalten. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld, dessen Richtung sich mit einer konstanten Frequenz änderte. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass größere DNA-Moleküle auf Richtungsänderungen des elektrischen Feldes langsamer reagieren als kleinere. Nach Anfärben des Agarosegels mittels Ethidiumbromid konnten die aufgetrennten Fragmente mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden. Die PFGE-Profile der *Salmonella*-Isolate von unterschiedlichen Probenahmestellen und aus unterschiedlichen Probenarten wurden anschließend miteinander verglichen. Zur Erstellung eines Dendrogramms wurde die Software Bionumerics v 6.01 (Applied Maths) verwendet. Die Cluster-Analyse erfolgte mit der UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)-Methode.

#### 4.8 Semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von *Campylobacter* spp.

##### 4.8.1 Herstellung einer Dezimalverdünnungsreihe in Preston-Bouillon

Die Bestimmung der Keimzahl von *Campylobacter* spp. in den Brühwasser-, Nackenhaut- und Blinddarmproben erfolgte mittels eines semiquantitativen Verfahrens in Anlehnung an ISO/TS 10272-3:2010. Zunächst wurden pro Probe 9,0 ml der Erstverdünnung mit Preston-Bouillon (vgl. Kap. 4.2) in ein Reagenzglas pipettiert. In ein zweites Reagenzglas wurde 1 ml der Erstverdünnung überführt. Durch Pipettieren von 0,1 ml aus dem 1 ml-Reagenzglas in ein Röhrchen mit 0,9 ml Preston-Bouillon und durch weitere identische Verdünnungsschritte wurde eine Dezimalverdünnungsreihe hergestellt (vgl. Tab. 24 und Tab. 25).

**Tabelle 24: Verdünnung, Anreicherungs-volumen und Probeneinwaage der Nackenhautproben in Preston-Bouillon**

Verdünnung	Anreicherungs-volumen	Probeneinwaage (Nackenhautprobe)
$10^{-1}$	9,0 ml	0,1 g
$10^{-2}$	0,9 ml	0,01 g
$10^{-3}$	0,9 ml	0,001 g
$10^{-4}$	0,9 ml	0,0001 g
$10^{-5}$	0,9 ml	0,00001 g
$10^{-6}$	0,9 ml	0,000001 g
$10^{-7}$	0,9 ml	0,0000001 g
$10^{-8}$	0,9 ml	0,00000001 g

**Tabelle 25: Verdünnung, Anreicherungs-volumen und Probeneinwaage der Blinddarm- und Brühwasserproben in Preston-Bouillon**

Verdünnung	Anreicherungs-volumen	Probeneinwaage (Blinddarm-/Brühwasserprobe)
$10^0$	9,0 ml	1,0 g/ml
$10^{-1}$	0,9 ml	0,1 g/ml
$10^{-2}$	0,9 ml	0,01 g/ml
$10^{-3}$	0,9 ml	0,001 g/ml
$10^{-4}$	0,9 ml	0,0001 g/ml
$10^{-5}$	0,9 ml	0,00001 g/ml
$10^{-6}$	0,9 ml	0,000001 g/ml
$10^{-7}$	0,9 ml	0,0000001 g/ml

Die Verdünnungsreihen wurden 24 h bei 42 °C unter mikroaerober Atmosphäre inkubiert. Die mikroaerobe Atmosphäre wurde in luftdicht verschließbaren Anaerobentöpfen durch Zugabe eines Gasentwicklers erzeugt. Nach Herstellerangaben betrug die endgültige Gaskonzentration nach etwa 5 h ca. 8 bis 10 Vol. % Kohlendioxid und 5 bis 7 Vol. % Sauerstoff (Merck, 2003).

### 4.8.2 Isolierung von *Campylobacter* spp. auf mCCDA-Agar

Jede Anreicherungskultur in Preston-Bouillon wurde nach der Inkubation mit einer sterilen Impföse auf mCCDA-Platten ausgestrichen. Die mCCDA-Platten wurden in vier Sektoren unterteilt, sodass pro Probe insgesamt zwei mCCDA-Platten für alle acht Verdünnungsstufen benötigt wurden. Die Inkubation der mCCDA-Platten erfolgte für 48 h bei 42° C in einer mikroaeroben Atmosphäre.

### 4.8.3 Bestätigung von *Campylobacter* spp.

Nach Inkubation der mCCDA-Platten (vgl. Kap. 4.8.2) wurde jede Verdünnungsstufe mit sichtbarem Bakterienwachstum auf *Campylobacter* spp. mittels Multiplex-PCR nach Wang et al. (2002) überprüft. Dafür wurde zunächst eine DNA-Extraktion in Anlehnung an Walsh et al. (1991) mit den folgenden Schritten durchgeführt:

- 1) Koloniematerial von der Platte in 500 µl 0,1 % TE-Puffer waschen
- 2) zentrifugieren (4 Minuten, 14.000 rpm)
- 3) Pellet in 400 µl 5 % Chelex resuspendieren
- 4) 1 Stunde bei 56 °C und 700 rpm inkubieren
- 5) 15 Minuten bei 95 °C und 700 rpm inkubieren
- 6) zentrifugieren (10 Minuten 14.000 rpm)
- 7) Überstand als PCR-Template einsetzen

Anschließend wurde der Mastermix nach dem Pipettierschema in Tabelle 26 erstellt. Die dafür verwendeten Primer für den *Campylobacter*-Nachweis nach Wang et al. (2002) und Chaban et al. (2009) sind in Kapitel 3.3.1 aufgeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurde DNA der in Kapitel 3.2.1 aufgeführten *Campylobacter*- bzw. *Salmonella*-Referenzstämme verwendet. Die Referenzstamm-DNA wurde jeweils parallel zu der Proben-DNA mittels Chelex extrahiert. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit dem in Tabelle 27 aufgeführten Programm.

**Tabelle 26: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes für den PCR-Nachweis von *Campylobacter* spp. in Anlehnung an Wang et al. (2002)**

Komponente	Volumen/Ansatz
10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	8,0 µl
dNTPs [10 mM]	1,5 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,1 µl
Primer CJF	0,25 µl
Primer CJR	0,25 µl
Primer CCF	0,5 µl
Primer CCR	0,5 µl
Primer CISybF	0,25 µl
Primer CISybR	0,25 µl
Proben-DNA/Kontroll-DNA	2,0 µl
<i>A. bidest.</i>	8,9 µl
Σ	25,0 µl

**Tabelle 27: Cyclor-Programm für den Multiplex-PCR-Nachweis von *Campylobacter* spp. in Anlehnung an Wang et al. (2002)**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	60 °C	45 s
Elongation	72 °C	45 s
Abschließende Elongation	72 °C	5 min

Die anschließende Gelelektrophorese und Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Als *Campylobacter* positiv wurden diejenigen Isolate bewertet, die eine Bande bei 323 bp (*C. jejuni*), 126 bp (*C. coli*) oder 180 bp (*C. lari*) zeigten.

#### 4.8.4 Bestimmung des MPN-Wertes für *Campylobacter* spp.

Zur Bestimmung des Most Probable Number (MPN)-Wertes wurde die höchste Verdünnung mit bestätigtem *Campylobacter*-Wachstum verwendet. Das Ergebnis wurde aus einer nach ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E) modifizierten MPN-Tabelle abgelesen (vgl. Tab. 38 und Tab. 39 im Anhang). Waren alle Tests auf *Campylobacter*-negativ, so wurde das Ergebnis als MPN=0/g angegeben. Dies bedeutete, dass keine *Campylobacter* spp. in der niedrigsten

Verdünnung in 0,1 g Nackenhautprobe bzw. 1,0 g Blinddarm- oder Brühwasserprobe nach Anreicherung nachweisbar waren.

#### 4.8.5 Isolierung von *Campylobacter* spp. auf MHB-Agar

Zur Isolierung von *Campylobacter* spp. auf Müller-Hinton-Blutagar (MHB) wurden drei bis fünf verdächtige Kolonien pro Probe aus den mCCDA-Platten (vgl. Kap. 4.8.2) abgepickt und auf MHB-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation der MHB-Platten für 48 h bei 42 °C in einer mikroaeroben Atmosphäre wurde das Wachstum von *Campylobacter* spp. mittels PCR wie in Kapitel 4.8.3 aufgeführt bestätigt. Bis zu fünf Reinkultur-Isolate pro Probe wurden für die weitere Typisierung (vgl. Kap. 4.10) verwendet.

#### 4.9 Nachweis von *Campylobacter* spp. in den Tupferproben

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. in den Tupferproben erfolgte in Anlehnung an ISO/TS 10272-3:2010. Die Anreicherung der Tupferproben erfolgte in 10 ml Preston-Bouillon unter einer mikroaeroben Atmosphäre für 24 h bei 42 °C. Die anschließende Isolierung auf mCCDA-Platten und die PCR-Bestätigung wurden wie in Kapitel 4.8.2 und 4.8.3 beschrieben durchgeführt. Die Isolierung der Reinkulturen auf MHB-Platten erfolgte wie in Kapitel 4.8.5 erläutert.

#### 4.10 Typisierung der *Campylobacter*-Isolate

Die Typisierung der *Campylobacter*-Isolate erfolgte mittels *flaA*-Sequenzierung. Dazu wurde das komplette *flaA*-Gen eines Isolates mit den Primern FLA4F und FLA1728R nach Meinersmann et al. (1997) amplifiziert (vgl. Tab. 28 und Tab. 29).

**Tabelle 28: Pipettierschema zur Erstellung des Mastermixes mit den Primern FLA4F und FLA1728R (Meinersmann et al., 1997)**

Komponente	Volumen/Ansatz
10 x Reaktionspuffer	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3,0 µl
dNTPs [10 mM]	2,0 µl
Taq Polymerase [5 U/µl]	0,4 µl
Primer CJF	0,25 µl
Primer CJR	0,25 µl
Proben-DNA/Kontroll-DNA	5,0 µl
<i>A. bidest.</i>	34,1 µl
Σ	50,0 µl

**Tabelle 29: Cycler-Programm für die Amplifikation des *flaA*-Gens (Meinersmann et al., 1997)**

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	55 °C	60 s
Elongation	72 °C	60 s
Abschließende Elongation	72 °C	5 min

Nach der PCR erfolgte eine Aufreinigung des PCR Produktes mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA). Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit einem NanoDrop Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA) bestimmt. Jeweils 100 bis 400 ng PCR-Produkt wurden mit 0,25 µM des jeweiligen Sequenzierungsprimer zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt. Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde die Software Bionumerics v6.1 (Applied Maths) verwendet. Nach Trimmen der Sequenzen wurde die *flaA*-Sequenz-Nummer anhand der PubMLST-Datenbank (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity) ermittelt.

#### 4.11 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm JMP (Version 11.0, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Der Vergleich der Nackenhaut-Keimzahlen zwischen mehreren Prozessstationen oder zwischen unterschiedlichen Herden erfolgte mittels eines Kruskal-Wallis-Tests. Das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 festgelegt. Ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Prozessstationen, so wurde der Mann-Whitney-U-Test als Post-hoc-Test angewandt. In diesem Fall erfolgte eine Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni: Das festgelegte  $\alpha$ -Niveau von 0.05 wurde durch die Anzahl an Paarvergleichen geteilt. So wurde im Falle der Nackenhautproben bei drei Paarvergleichen das Signifikanzniveau für den Mann-Whitney-U-Test auf 0.0167 korrigiert.

Die Abbildungen für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden mittels JMP 11.0 oder Microsoft Office Excel erstellt. Für die Darstellung der aeroben mesophilen Keimzahlen, der Anzahl an *Enterobacteriaceae* und *Campylobacter* spp. wurden Boxplots verwendet. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand und stellt den Bereich dar, in dem 50 % aller Datenwerte liegen. Der obere und untere Whisker kennzeichnet Maxima und Minima der Werte bis zu einer Länge des 1,5-fachen Interquartilsabstandes. Werte, die größer oder kleiner als das 1,5-fache des Interquartilsabstandes sind, werden durch einen schwarzen

Punkt als Ausreißer dargestellt. Die Ausreißer werden bei der Interpretation der Ergebnisse als Maxima oder Minima berücksichtigt.

## 5 Ergebnisse

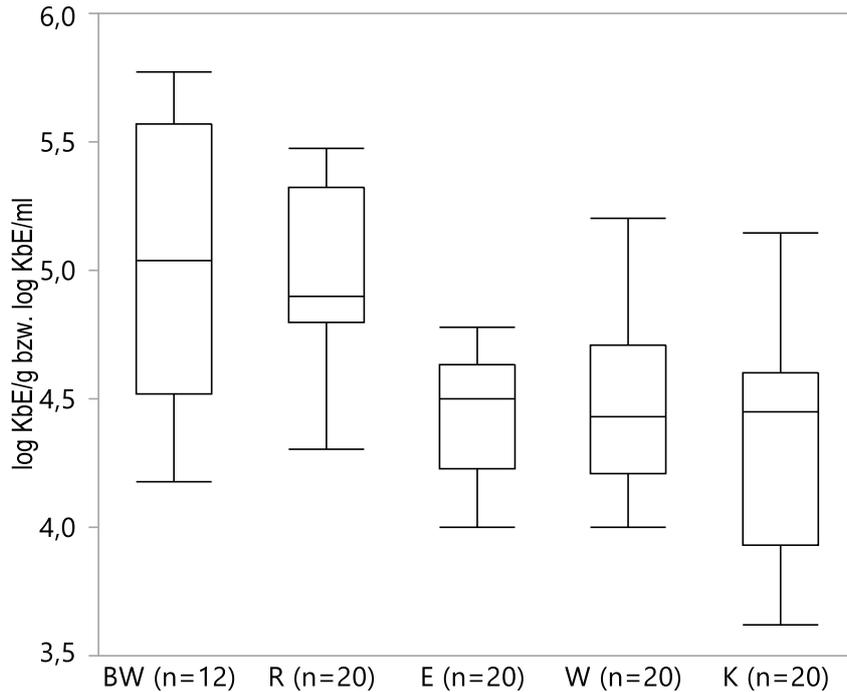
In zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben wurden insgesamt 414 Proben während und nach der Schlachtung von elf unterschiedlichen Broilerherden entnommen. Bei insgesamt 194 der Proben wurden allgemeine mikrobiologische Hygieneparameter (aerobe mesophile Keimzahl, Anzahl an *Enterobacteriaceae*) sowie bei 270 Proben die Anzahl an *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. bestimmt. Weitere 144 Proben wurden qualitativ auf *Salmonella* spp. oder *Campylobacter* spp. untersucht. Eine Typisierung erfolgte bei 88 *Salmonella*- und bei 342 *Campylobacter*-Isolaten.

### 5.1 Aerobe mesophile Keimzahl

Die Ergebnisse für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahlen der Brühwasser- und Nackenhautproben sind in Abbildung 8 (Betrieb A) und in Abbildung 9 (Betrieb B) graphisch dargestellt.

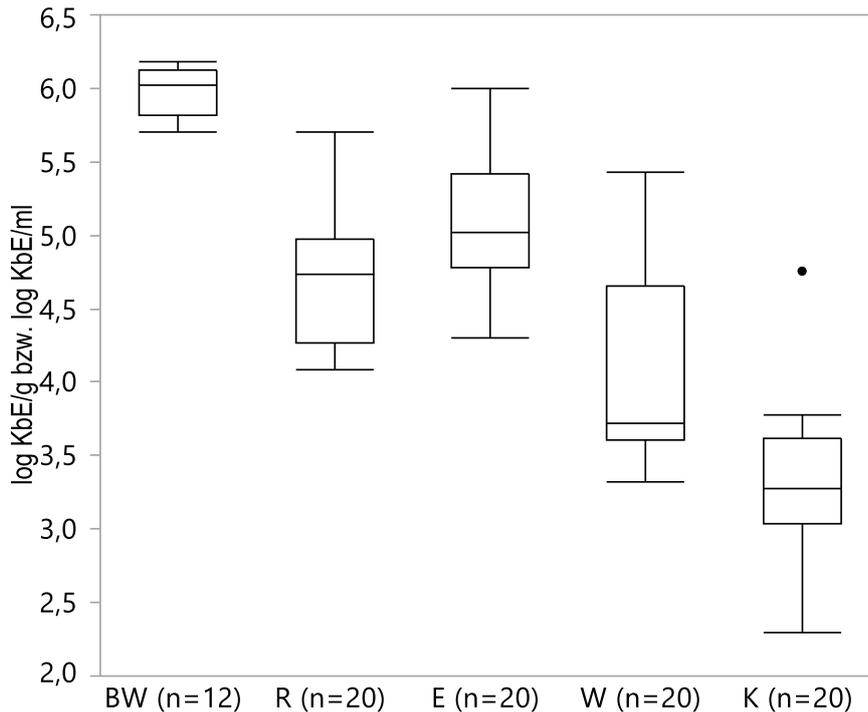
Die graphischen Darstellungen für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl und der Anzahl an *Enterobacteriaceae* berücksichtigen jeweils die Ergebnisse der Beprobung von vier Herden in Betrieb A (Herde A1, A2, A3 und A4) und vier Herden in Betrieb B (Herde B1, B2, B3 und B4). Alle Proben wurden mindestens 10 Minuten nach Beginn der Schlachtung einer Herde in jeweils gleicher Reihenfolge gezogen (vgl. Kap. 4.1.2).

In Betrieb A lagen die Werte der aeroben mesophilen Keimzahlen in den Brühwasserproben zwischen 4,2 und 5,8 log KbE/ml Brühwasser und in den Nackenhautproben zwischen 3,6 und 5,5 log KbE/g Nackenhaut. In den Nackenhautproben lag der Medianwert nach dem Rupfen mit 4,9 log KbE/g am höchsten. Nach der Eviszation kam es zu einer signifikanten Abnahme der aeroben mesophilen Keimzahl in den Nackenhautproben ( $p < 0.0167$ , zur Bonferroni-Korrektur siehe Kap. 4.11); der Medianwert lag etwa 0,4 log-Stufen niedriger als nach dem Rupfen. In den folgenden Prozessstufen – nach dem Waschen und Kühlen – kam es zu keiner signifikanten Änderung der aeroben Keimzahlen.



**Abbildung 8: Aerobe mesophile Keimzahlen der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb A. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima**

In Betrieb B lagen die Werte in den Brühwasserproben zwischen 5,7 und 6,2 log KbE/ml und in den Nackenhautproben zwischen 2,3 und 6,0 log KbE/g (vgl. Abb. 9). Nach dem Rupfen lag der Medianwert bei etwa 4,7 log KbE/g. Im Gegensatz zu Betrieb A kam es in Betrieb B nach der Eviszeration zu einer Erhöhung der aeroben mesophilen Keimzahlen der Nackenhautproben: Der Medianwert nahm nach der Eviszeration um etwa 0,3 log-Stufen zu. Nach dem anschließenden Waschvorgang (Innen-Außenwäscher) nahm der Median um etwa 1,3 log-Stufen und nach dem Kühlen um etwa 0,5 log-Stufen ab. Die Änderung der aeroben mesophilen Keimzahlen in den Nackenhautproben nach der Eviszeration, nach dem Waschen und nach dem Kühlen war jeweils signifikant ( $p < 0.0167$ ).

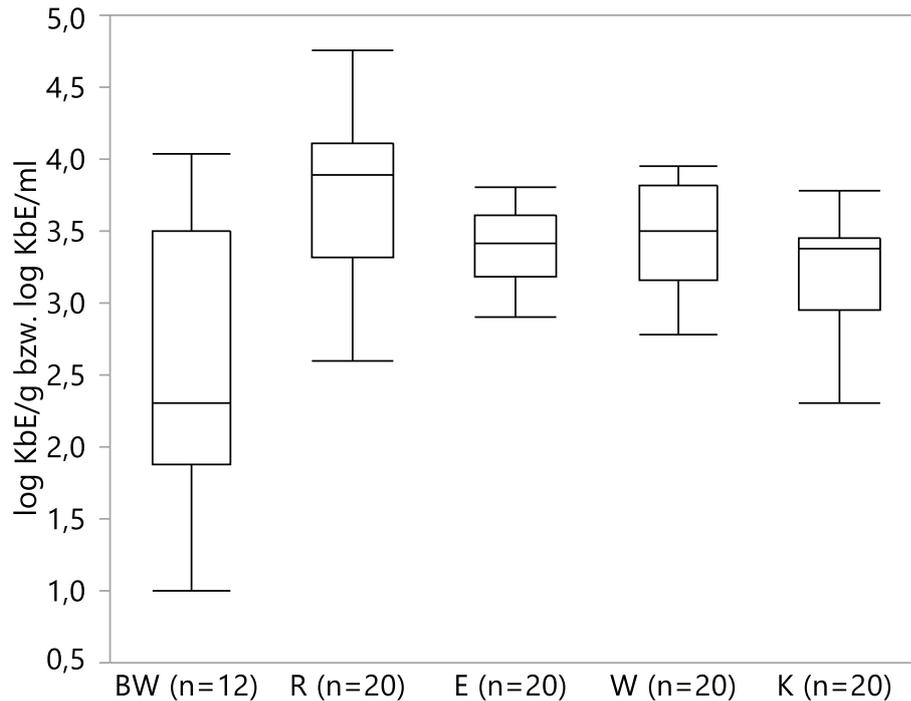


**Abbildung 9: Aerobe mesophile Keimzahlen der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb B. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima**

## 5.2 *Enterobacteriaceae*

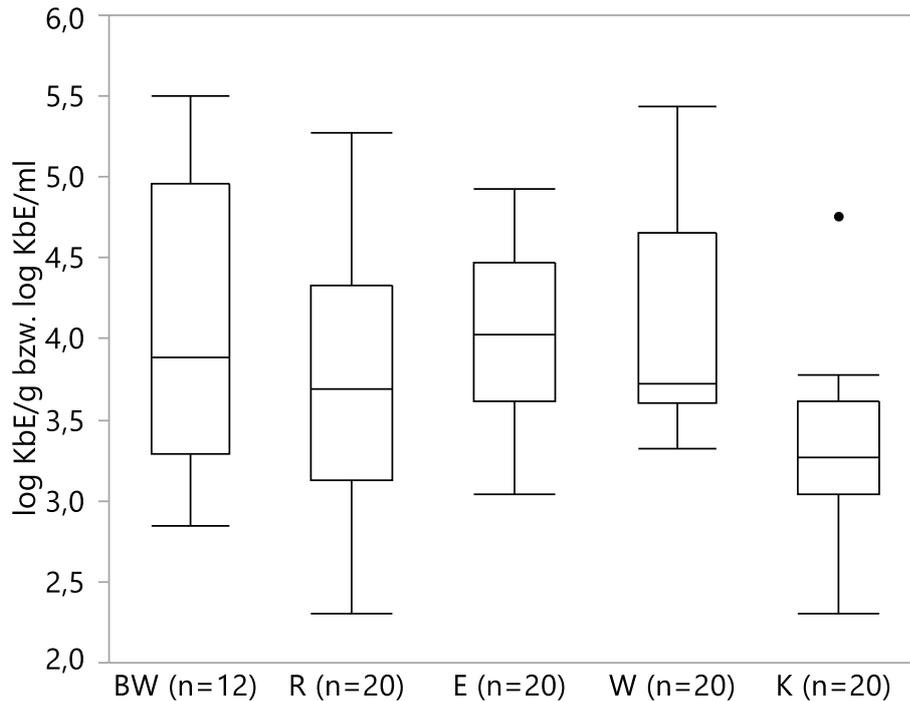
In Abbildung 10 und Abbildung 11 sind die Anzahlen an *Enterobacteriaceae* der Brühwasser- und Nackenhautproben für Betrieb A bzw. für Betrieb B dargestellt.

In den Brühwasserproben aus Betrieb A wurden *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen zwischen 1,0 und 4,0 log KbE/ml bei einem Median von 2,3 log KbE/ml ermittelt. Die Keimzahlen in den Nackenhautproben lagen zwischen 2,3 und 4,8 log KbE/g und waren nach dem Rupfen am höchsten (Median 3,9 log KbE/g). Nach der Eviszeration kam es zu einer signifikanten Reduktion der *Enterobacteriaceae*-Zahlen ( $p < 0.0167$ , zur Bonferroni-Korrektur siehe Kap. 4.11). Der Medianwert nahm nach der Eviszeration um etwa 0,5 log-Stufen ab. Die Änderung der Keimzahlen nach dem Waschen und nach dem Kühlen war nicht signifikant.



**Abbildung 10: Anzahl an *Enterobacteriaceae* der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb A. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima**

In Betrieb B wurden in den Brühwasserproben *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen zwischen etwa 2,8 und 5,5 log KbE/ml (Median 3,9 log KbE/ml) nachgewiesen. In den Nackenhautproben lagen die Keimzahlen zwischen 2,3 und 5,4 log KbE/g. Der höchste Medianwert von 4,0 log KbE/g wurde nach der Eviszeration ermittelt. Der Median lag nach dem Rupfen und nach dem Waschen jeweils bei etwa 3,7 log KbE/g. Nach dem Kühlen kam es zu einer signifikanten Änderung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen ( $p < 0.0167$ ); der Medianwert nahm um etwa 0,4 log-Stufen ab (vgl. Abb. 11).



**Abbildung 11: Anzahl an *Enterobacteriaceae* der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) in Betrieb B. Boxplots mit Median, Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima**

### 5.3 *Salmonella* spp.

#### 5.3.1 Anzahl an positiven Proben

Bei insgesamt vier von sechs im Mastbetrieb *Salmonella*-positiven Broilerherden wurden *Salmonella* spp. auch während der Schlachtung nachgewiesen. Zwei der untersuchten Herden in Betrieb A (Herde A2 und A3) und zwei der untersuchten Herden in Betrieb B (Herde B1 und B2) waren in den während der Schlachtung entnommenen Proben *Salmonella* positiv. Bei den übrigen fünf im Mastbetrieb *Salmonella*-negativen Herden wurden keine *Salmonella* während der Schlachtung detektiert.

Tabelle 30 stellt die Prävalenzen bei den während der Schlachtung *Salmonella*-positiven Herden dar. In Betrieb A lag die Prävalenz in den Blinddarm- und Nackenhautproben nach dem Waschen und Kühlen bei maximal 20 %. Die Prävalenz in den Brühwasser- und den Nackenhautproben nach dem Rupfen und nach der Eviszeration schwankte zwischen 0 % und 100 %. In Betrieb B waren 40 % (Herde B1) und 60 % (Herde B2) der Blinddarmproben *Salmonella*-positiv. Der Anteil an *Salmonella*-positiven Brühwasser- und Nackenhautproben lag bei 80 % bis 100 % (vgl. Tab. 30).

**Tabelle 30: *Salmonella*-Prävalenz in Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei zwei Herden in Betrieb A (A2 und A3) und zwei Herden in Betrieb B (B1 und B2)**

Herde	<i>Salmonella</i> -Prävalenz					
	BD	BW	R	E	W	K
A2	0 % (0/5)	33 % (1/3)	20 % (1/5)	80 % (4/5)	20 % (1/5)	20 % (1/5)
A3	20 % (1/5)	100 % (3/3)	80 % (4/5)	0 % (0/5)	20 % (1/5)	0 % (0/5)
B1	60 % (3/5)	100 % (3/3)	100 % (5/5)	80 % (4/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
B2	40 % (2/5)	100 % (3/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	80 % (4/5)	100 % (5/5)

BD=Blinddarmproben; BW=Brühwasserproben; Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen)

Nach der Schlachtung von vier Herden (Herde A3, A4, B4 und B7) wurden insgesamt 72 Tupferproben von Schlachtgeräten auf *Salmonella* spp. untersucht. Alle untersuchten Tupferproben waren *Salmonella*-negativ.

### 5.3.2 Mini-MPN-Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von *Salmonella* spp.

In Betrieb A lag der MPN-Wert der *Salmonella*-positiven Proben zwischen 0,14 und 260 *Salmonella*/g bzw. *Salmonella*/ml Probe. Dabei lag das Maximum der positiven Nackenhautproben bei MPN=14/g und der positiven Brühwasserproben bei MPN=53/g. In einer Blinddarmprobe wurden Salmonellen mit einem MPN-Wert von 260 *Salmonella* pro Gramm nachgewiesen (vgl. Tab. 31).

Die MPN-Werte der positiven Proben in Betrieb B lagen zwischen 0,14 und 470 *Salmonella*/g bzw. *Salmonella*/ml Probe. Die Maximalwerte lagen in den Nackenhaut-, Brühwasser- und Blinddarmproben bei 470, 140 und 130 *Salmonella*/g MPN.

Eine Übersicht über die Verteilung der MPN-Werte an den einzelnen Probenahmestellen gibt Tabelle 31. Aufgrund der insgesamt geringen Nachweisrate an *Salmonella* spp. in den untersuchten Proben (vgl. Kap. 5.3.1) wurde keine statistische Signifikanzberechnung zur Untersuchung der Keimzahländerungen im Prozessverlauf durchgeführt.

**Tabelle 31: Anzahl an *Salmonella* spp. in den Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei während der Schlachtung *Salmonella*-positiven Herden**

Betrieb	Probe (Anzahl)	Minimum	25 %-Quartil	Median	75 %-Quartil	Maximum
A	BD (n=10)	0	0	0	130	260
	BW (n=6)	0	0	2,52	23,75	53
	R (n=10)	0	0	0,07	0,14	1,9
	E (n=10)	0	0	0	0,14	0,14
	W (n=10)	0	0	0	0,035	14
	K (n=10)	0	0	0	0	0,14
B	BD (n=10)	0	0	1,1	5,775	130
	BW (n=6)	27	46,5	87	132,5	140
	R (n=10)	0,14	1,46	14	110,5	330
	E (n=10)	0	1,9	12,5	105,25	470
	W (n=10)	0	1,46	19	312,5	470
	K (n=10)	0,14	1,235	4,9	20,675	130

BD=Blinddarmproben; BW=Brühwasserproben; Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen); Brühwasserproben in MPN/ml; Nackenhaut- und Blinddarmproben in MPN/g

### 5.3.3 Typisierung der *Salmonella*-Isolate

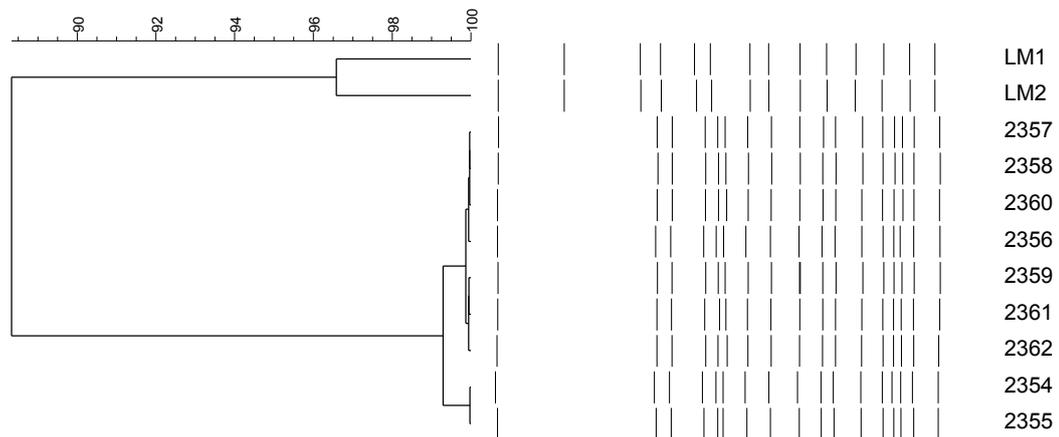
Insgesamt wurden 88 *Salmonella*-Isolate einer serologischen Typisierung durch das Bundesinstitut für Risikobewertung unterzogen (vgl. Kap. 4.7). Bei zwei an unterschiedlichen Tagen geschlachteten Herden (Herde A2 und A3) in Betrieb A wurden alle typisierten Isolate dem Serotyp *S. Infantis* mit der Seroformel 6,7:r:1,5 zugeordnet (vgl. Tab. 32).

**Tabelle 32: Serologische Charakterisierung der *Salmonella*-Isolate nach dem White-Kauffmann-Le-Minor-Schema (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014)**

Probenahmestelle	Nachgewiesener <i>Salmonella</i> -Serotyp (Anzahl typisierter Isolate)			
	Herde A2	Herde A3	Herde B1	Herde B2
Blinddarm	k.n.	<i>S. Infantis</i> (2)	<i>S. Paratyphi B</i> (2)	<i>S. Paratyphi B</i> (2)
Brühwasser	<i>S. Infantis</i> (5)	<i>S. Infantis</i> (6)	<i>S. Paratyphi B</i> (3)	<i>S. Paratyphi B</i> (2)
nach Rupfen*	<i>S. Infantis</i> (5)	<i>S. Infantis</i> (8)	<i>S. Paratyphi B</i> (3)	<i>S. Paratyphi B</i> (2)
nach Eviszeration*	<i>S. Infantis</i> (15)	k.n.	<i>S. Paratyphi B</i> (4)	<i>S. Paratyphi B</i> (2)
nach Waschen*	<i>S. Infantis</i> (5)	<i>S. Infantis</i> (2)	<i>S. Paratyphi B</i> (4)	<i>S. Paratyphi B</i> (3)
nach Kühlen*	<i>S. Infantis</i> (5)	k.n.	<i>S. Paratyphi B</i> (3)	<i>S. Paratyphi B</i> (5)

\*=Nackenhautprobe; k.n.=kein Nachweis von *Salmonella* spp.

Bei den *Salmonella*-positiven Herden (Herde B1 und B2) in Betrieb B wurde jeweils der Serotyp *S. Paratyphi B* (d-Tartrat-positive Variante) mit der Seroformel (1),4,12:b:1,2 ermittelt (vgl. Tab. 32). Die Analyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese zeigte ein identisches Bandenmuster (>95 % Übereinstimmung) zwischen den Isolaten jeweils einer Herde und eines Serotyps nach Restriktionsenzymverdau mittels *Xba*I (vgl. Abb. 12).



**Abbildung 12: Dendrogramm-Darstellung der PFGE-Bandenmuster der *Salmonella Paratyphi B*-Isolate bei der Herde B1 in Betrieb B (die Zahlen sind Stammnummern; LM=Längenmarker)**

## 5.4 *Campylobacter* spp.

### 5.4.1 Anzahl an positiven Proben

Bei zehn von elf der untersuchten Herden wurden *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Eine Herde (Herde A2) war in allen untersuchten Proben *Campylobacter*-negativ. Bei den *Campylobacter*-positiven Herden in Betrieb A lag die Prävalenz in den Blinddarm- und Nackenhautproben jeweils bei 100 %. In den Brühwasserproben wurden in einer (Herde A1), in drei (Herde A3) oder in keiner (Herde A4) der jeweils drei untersuchten Proben *Campylobacter* spp. nachgewiesen (vgl. Tab. 33).

**Tabelle 33: *Campylobacter*-Prävalenz in Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben in Betrieb A (Herde A1, A2, A3 und A4) und in Betrieb B (Herde B1, B2, B3, B4, B5, B6 und B7)**

Herde	<i>Campylobacter</i> -Prävalenz					
	BD	BW	R	E	W	K
A1	100 % (5/5)	33 % (1/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
A2	0 % (0/5)	0 % (0/3)	0 % (0/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)
A3	100 % (5/5)	100 % (3/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
A4	100 % (5/5)	0 % (0/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
B1	0 % (0/5)	67 % (2/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
B2	100 % (5/5)	100 % (3/3)	80 % (4/5)	100 % (5/5)	80 % (4/5)	100 % (5/5)
B3	0 % (0/5)	100 % (3/3)	40 % (2/5)	100 % (5/5)	40 % (2/5)	40 % (2/5)
B4	100 % (5/5)	100 % (3/3)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
B5	60 % (3/5)	100 % (3/3)	n.d.	100 % (5/5)	n.d.	n.d.
B6	60 % (3/5)	33 % (1/3)	n.d.	100 % (10/10)	n.d.	n.d.
B7	100 % (5/5)	n.d.	n.d.	90 % (9/10)	n.d.	n.d.

BD=Blinddarmproben; BW=Brühwasserproben; Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen); n.d. =Probenahme nicht durchgeführt

In Betrieb B wurden vier an unterschiedlichen Tagen geschlachtete Herden (B1, B2, B3 und B4) sowie drei am gleichen Tag hintereinander geschlachtete Herden (B5, B6 und B7) beprobt. Zwei dieser Herden (B1, B3) wiesen in den Blinddarmproben keine *Campylobacter* spp. auf; der Nachweis in den Brühwasser- und Nackenhautproben verlief positiv. Bei der Herde B1 wurden in zwei von drei der Brühwasser- und in 20 (100 %) der Nackenhautproben *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Die während der Schlachtung der Herde B3 entnommenen drei Brühwasserproben waren *Campylobacter* positiv, während in 11 (55 %) der Nackenhautproben dieser Herde *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden. Dabei betrug der Anteil an positiven Nackenhautproben bei Herde B3 nach der Eviszeration 100 % (vgl. Tab. 33).

Bei den Herden B2 und B4 waren alle untersuchten Blinddarmproben *Campylobacter* positiv. In den Brühwasser- und Nackenhautproben dieser Herden wurden *Campylobacter* spp. mit einem Anteil von 80 bis 100 % positiver Proben nachgewiesen (vgl. Tab. 33).

Alle drei hintereinander geschlachteten Herden wiesen *Campylobacter* spp. in den Blinddarmproben mit einem Anteil von 60 % (Herde B5 und B6) bzw. 100 % (Herde B7) auf. In drei von drei während der Schlachtung der Herde B5 gezogenen Brühwasserproben und in einer von drei während der Schlachtung der Herde B6 gezogenen Brühwasserproben wurden *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Die nach der Eviszeration gezogenen

Nackenhautproben waren bei allen drei hintereinander geschlachteten Herden bis auf eine Probe der Herde B7 positiv (vgl. Tab. 33).

Nach der Schlachtung der Herden A3, A4, B4 und B7 waren je nach Probenahmestelle bis zu drei von jeweils drei der vor der Reinigung und Desinfektion entnommenen Tupferproben *Campylobacter* positiv (vgl. Tab. 34).

**Tabelle 34: *Campylobacter*-Prävalenz in Tupferproben von den Schlachtgeräten nach der Schlachtung von zwei Herden in Betrieb A (Herde A3 und A4) und zwei Herden in Betrieb B (Herde B4 und B7)**

Herde	<i>Campylobacter</i> -Prävalenz					
	Rupffinger	Kloaken- schneider	Körperhöhlen- öffner	Ausnehmer	Nackenhaut- schneider	Vakuumsauger
A3	100 % (3/3)	67 % (2/3)	100 % (3/3)	100 % (3/3)	100 % (3/3)	100 % (3/3)
A4	100 % (3/3)	100 % (3/3)	33 % (1/3)	100 % (3/3)	33 % (1/3)	33 % (1/3)
B4	33 % (1/3)	100 % (3/3)	67 % (2/3)	67 % (2/3)	100 % (3/3)	67 % (2/3)
B7	67 % (2/3)	0 % (0/3)	0 % (0/3)	100 % (3/3)	33 % (1/3)	67 % (2/3)

#### 5.4.2 Semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Keimzahl von *Campylobacter* spp.

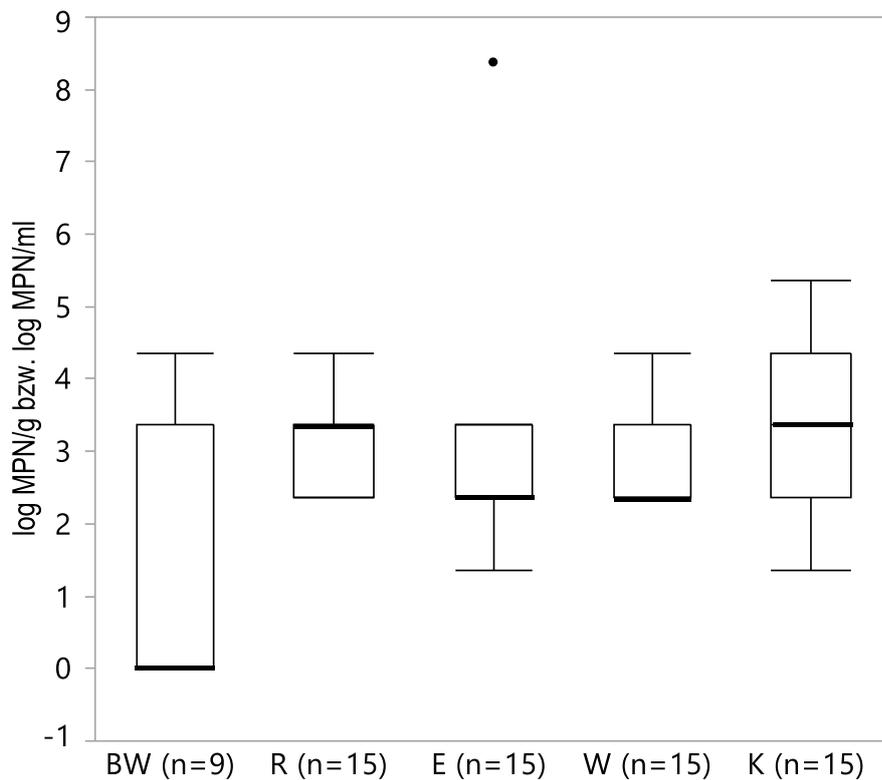
Die Bestimmung der Keimzahl von *Campylobacter* spp. erfolgte für die Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben. Die höchste Verdünnung mit bestätigtem *Campylobacter*-Wachstum wurde für die Ablesung der Keimzahlen entsprechend der Tabellen 38 und 39 (siehe Anhang) verwendet. Die Keimzahlen wurden anschließend für die statistischen Berechnungen und für die graphische Darstellung log-transformiert.

Die Abbildungen 13 und 14 fassen die semiquantitativen *Campylobacter*-Befunde bei den einzeln beprobten Herden in Betrieb A (Herde A1, A3 und A4) und in Betrieb B (Herde B1, B2, B3 und B4) zusammen. Die graphischen Darstellungen berücksichtigen alle ermittelten MPN-Werte, einschließlich negativer Proben (MPN=0/g bzw. MPN=0/ml), bei Herden mit einem gleichen zeitlichen Ablauf der Probenahme. Das heißt, es wurden alle Proben mindestens 10 Minuten nach Beginn der Schlachtung einer Herde in jeweils gleicher Reihenfolge gezogen (vgl. Kap. 4.1.2). Die Ergebnisse der Herde A2 wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen, da alle Proben dieser Herde *Campylobacter*-negativ waren.

In beiden Betrieben wurden aus Blinddarmproben *Campylobacter* spp. mit Keimzahlen bis zur oberen Nachweisgrenze ( $\geq 7,4 \log$  MPN/g) isoliert. Der Median der MPN-Werte bei Blinddarm-positiven Herden lag in Betrieb A bei etwa  $6,4 \log$  MPN/g und in Betrieb B bei

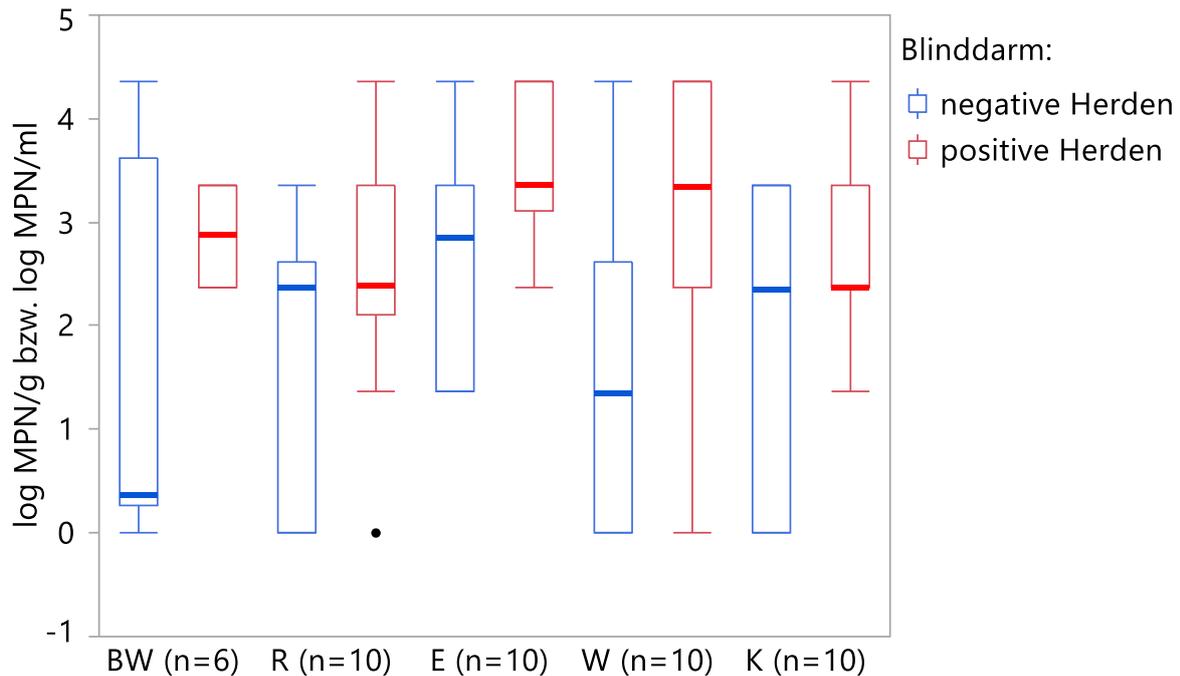
etwa 5,9 log MPN/g. Die MPN-Werte in den Brühwasserproben lagen in beiden Betrieben zwischen 0 und etwa 4,4 log MPN/ml Probe.

In Betrieb A wurden *Campylobacter*-Keimzahlen in den Nackenhautproben von etwa 1,4 bis  $\geq 8,4$  log MPN/g (obere Nachweisgrenze) ermittelt. Die Median-Werte der MPN-Keimzahlen in den Nackenhäuten waren in Betrieb A nach dem Entfedern und nach dem Kühlen mit etwa 3,4 log MPN/g am höchsten. Nach der Eviszeration und nach dem Waschen betrug der Medianwert jeweils etwa 2,4 log MPN/g (vgl. Abb. 13).



**Abbildung 13: Anzahl an *Campylobacter* spp. der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszeration, W=nach Waschen, K=nach Kühlen) bei drei blinddarmpositiven Herden in Betrieb A. Boxplots mit Median (breite Linien), Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima**

Die *Campylobacter*-Keimzahlen der Nackenhautproben in Betrieb B lagen zwischen 0 und etwa 4,4 log MPN/g. Der Median der MPN-Keimzahlen in den Nackenhäuten bei den blinddarmpositiven Herden war nach der Eviszeration und nach dem Waschen mit jeweils etwa 3,4 log MPN/g am höchsten. Nach dem Rupfen und Kühlen lag der Medianwert jeweils bei etwa 2,4 log MPN/g (vgl. Abb. 14). Bei den blinddarmnegativen Herden lag der Medianwert in den Nackenhäuten nach der Eviszeration mit etwa 2,9 log MPN/g am höchsten. Die Medianwerte nach dem Rupfen, Waschen und Kühlen lagen bei etwa 2,4, 1,4 und 2,4 log MPN/g (vgl. Abb. 14).



**Abbildung 14:** Anzahl an *Campylobacter* spp. der Brühwasser- (BW) und Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Köhlen) bei zwei blinddarmnegativen und zwei blinddarmpositiven Herden in Betrieb B. Boxplots mit Median (breite Linien), Quartilen (25 %, 75 %), Maxima und Minima

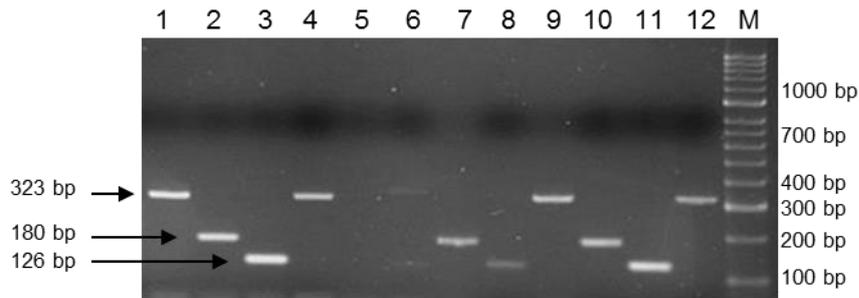
Tabelle 40 (siehe Anhang) fasst die MPN-Ergebnisse des semiquantitativen Untersuchungsverfahrens von *Campylobacter* spp. für beide Betriebe zusammen.

### 5.4.3 Speziesdifferenzierung der *Campylobacter*-Isolate

Die Speziesdifferenzierung erfolgte mittels Multiplex-PCR in Anlehnung an Wang et al. (2002). Für den Nachweis von *C. lari* wurden die Primer nach Chaban et al. (2009) eingesetzt (vgl. Abb. 15).

Bei zehn Herden mit einem positiven *Campylobacter*-Nachweis wurde die Spezies *C. jejuni* isoliert. Zwei dieser Herden (A4 und B1) wiesen zusätzlich die Spezies *C. coli* auf. *C. lari* wurde in keiner Probe nachgewiesen.

In insgesamt 256 (98,8 %) der 259 *Campylobacter*-positiven Proben wurde *C. jejuni* mittels Multiplex-PCR identifiziert. *C. jejuni* war an allen Probenahmestellen nachweisbar. Der Nachweis von *C. coli* erfolgte bei 31 (11,9 %) der *Campylobacter*-positiven Proben. Bei der Herde A4 wurde *C. coli* in den Blinddarm-, Nackenhaut- und Geräteproben in insgesamt 28 (75,7 %) der positiven Proben detektiert, während bei Herde B1 insgesamt drei (13,6 %) der positiven Proben (Nackenhautproben) *C. coli* enthielten.



**Abbildung 15:** Gelelektrophorese-Bild des Nachweises von *Campylobacter* spp. mittels Multiplex-PCR in Anlehnung an Wang et al. (2002) und Chaban et al. (2009). M=Marker; *C. jejuni* (1, 4, 9, 12); *C. coli* (3, 8, 11); *C. lari* (2, 7, 10)

#### 5.4.4 Typisierung der *Campylobacter*-Isolate

Eine *flaA*-Typisierung erfolgte bei 329 der *C. jejuni*-Isolate. Die zur Typisierung herangezogenen *Campylobacter*-Isolate stammten von vier an unterschiedlichen Tagen geschlachteten Herden (vgl. Tab. 35) sowie zusätzlich von drei am gleichen Tag hintereinander geschlachteten Herden (vgl. Tab. 36 und Tab. 37). Von ein und derselben Probe wurden bis zu fünf Isolate typisiert.

Bei der Herde A1 wurde der *flaA*-Typ 321 in den Blinddarmproben und in allen gezogenen Nackenhautproben nachgewiesen. Aus den Brühwasserproben wurden keine *Campylobacter* spp. isoliert. Die Herde A3 wies den *flaA*-Typ 264 in den Blinddarm-, Brühwasser-, Nackenhaut- und Geräteproben auf. Zusätzlich wurde bei der Herde A3 in zwei Proben der *flaA*-Typ 1208, in zwei Proben der *flaA*-Typ 34 und in jeweils einer Probe der *flaA*-Typ 1438 bzw. 54 ermittelt (vgl. Tab. 35).

In Herde B1 wurde der *flaA*-Typ 34 in den Nackenhautproben nachgewiesen. Die untersuchten Blinddarmproben waren *Campylobacter*-negativ. Eine Typisierung der Brühwasserproben war bei der Herde B1 nicht möglich, da keine Reinkulturen isoliert werden konnten. Bei der Herde B2 wurde der *flaA*-Typ 49 in den Blinddarm- und Nackenhautproben nachgewiesen. In einer Nackenhautprobe nach dem Köhlen wurde der *flaA*-Typ 315 detektiert (vgl. Tab. 35).

**Tabelle 35: *flaA*-Typen der *Campylobacter jejuni*-Isolate bei vier an unterschiedlichen Tagen geschlachteten Broilerherden aus zwei verschiedenen Broilerschlachtbetrieben**

Probenahmestelle	Nachgewiesener <i>flaA</i> -Typ (positive Isolate/typisierte Isolate)			
	Herde A1	Herde A3	Herde B1	Herde B2
Blinddarm	321 (5/5)	264 (7/7)	k.n.	49 (2/2)
Brühwasser	k.n.	264 (4/4)	k.r.	49 (3/3)
nach Rupfen*	321 (5/5)	264 (1/3) 34 (1/3) 54 (1/3)	34 (5/5)	49 (3/3)
nach Eviszeration*	321 (5/5)	264 (4/4)	34 (5/5)	49 (5/5)
nach Waschen*	321 (5/5)	264 (3/4) 1208 (1/4)	34 (5/5)	49 (3/3)
nach Kühlen*	321 (5/5)	264 (4/6) 34 (1/6) 1438 (1/6)	34 (5/5)	49 (3/4) 315 (1/4)
Rupffinger**	n.d	264 (1/1)	n.d	n.d
Kloakenschneider**	n.d	264 (5/5)	n.d	n.d
Körperhöhlenöffner**	n.d	264 (1/1)	n.d	n.d
Ausnehmer**	n.d	264 (7/8) 1208 (1/8)	n.d	n.d
Nackenhautschneider**	n.d	264 (3/3)	n.d	n.d
Vakuumsauger**	n.d.	264 (11/11)	n.d	n.d.

\*=Nackenhautprobe; \*\*=Gerätetupferprobe; n.d.=Probenahme nicht durchgeführt; k.n.=kein Nachweis von *Campylobacter* spp.; k.r.=keine Isolierung von Reinkulturen möglich

Die Ergebnisse der *flaA*-Typisierung der *Campylobacter*-Isolate bei drei hintereinander geschlachteten Herden zeigten, dass in der ersten Herde (Herde B5) vier unterschiedliche *flaA*-Typen auftraten (vgl. Tab. 36). Dabei war der *flaA*-Typ 49 (48 %) am häufigsten vertreten, gefolgt von dem *flaA*-Typ 117 (36 %) und *flaA*-Typ 105 (12 %). In der zweiten und dritten Herde dominierte der *flaA*-Typ 105 (B6: 62 % und B7: 75 %), während die *flaA*-Typen 49 und 117 in weniger als 30 % der Isolate vorkamen. In jeweils einem Isolat wurden die *flaA*-Typen 1552 und 34 nachgewiesen.

Tabelle 37 stellt die *flaA*-Typen der *C. jejuni*-Isolate aus den unterschiedlichen Probenahmestellen dar. Eine Isolierung von Reinkulturen von *C. jejuni* gelang nur bei zwei Blinddarmproben aus der ersten Herde. Somit lässt sich nicht feststellen, welche *flaA*-Typen bereits vor der Schlachtung in den Herden vertreten waren. Alle drei dominierenden *flaA*-Typen wurden auf den Geräteproben nach der Schlachtung der dritten Herde detektiert (vgl. Tab. 37).

**Tabelle 36: Prozentualer Anteil detektierter *flaA*-Typen der *C. jejuni*-Isolate bei drei hintereinander geschlachteten Broilerherden aus Betrieb B**

<i>flaA</i> -Typ	Herde B5	Herde B6	Herde 7	Geräte
49	48 % (12/25)	15 % (4/26)	20 % (4/20)	33 % (2/6)
105	12 % (3/25)	62 % (16/26)	75 % (15/20)	33 % (2/6)
117	36 % (9/25)	23 % (6/26)	5 % (1/20)	17 % (1/6)
1552	4 % (1/25)	0	0	0
34	0	0	0	17 % (1/6)

**Tabelle 37: *flaA*-Typen der *C. jejuni*-Isolate bei drei hintereinander geschlachteten Broilerherden aus Betrieb B**

Probenahmestelle	Nachgewiesener <i>flaA</i> -Typ (positive Isolate/typisierte Isolate)		
	Herde B5	Herde B6	Herde B7
Blinddarm	49 (3/6) 117 (3/6)	k.r.	k.r.
Brühwasser	49 (2/5) 117 (3/5)	117 (1/1)	k.n.
nach Rupfen*	n.d.	n.d.	n.d.
nach Eviszeration*	49 (7/14) 117 (3/14) 105 (3/14) 1552 (1/14)	49 (4/25) 117 (5/25) 105 (16/25)	49 (4/20) 117 (1/20) 105 (15/20)
nach Waschen*	n.d.	n.d.	n.d.
nach Kühlen*	n.d.	n.d.	n.d.
Rupffinger**	n.d.	n.d.	105 (1/1)
Kloakenschneider**	n.d.	n.d.	k.n.
Körperhöhlenöffner**	n.d.	n.d.	k.n.
Ausnehmer**	n.d.	n.d.	49 (2/3) 117 (1/3)
Nackenhautschneider**	n.d.	n.d.	105 (1/1)
Vakuumsauger**	n.d.	n.d.	34 (1/1)

\*=Nackenhautprobe; \*\*=Gerätetupferprobe; n.d.=Probenahme nicht durchgeführt; k.n.=kein Nachweis von *Campylobacter* spp.; k.r.=keine Isolierung von Reinkulturen möglich

## 6 Diskussion

Laut Zoonosentrendbericht der EFSA gehören *Campylobacteriosen* und *Salmonellosen* zu den am häufigsten gemeldeten Zoonosen in der EU im Jahr 2013 (EFSA und ECDC, 2015). Dabei ist Geflügelfleisch, insbesondere Hähnchenfleisch, häufig mit *Campylobacter* und *Salmonella* spp. belastet (BfR, 2015). Eine Kontamination von Hähnchenschlachtkörpern kann auf verschiedenen Stufen der Schlachtung erfolgen (Bryan und Doyle, 1995). In dieser Arbeit wurde die mikrobielle Kontamination von Hähnchenkarkassen vergleichend bei zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen untersucht (vgl. Kap. 4.1). Dazu wurden Blinddarm-, Brühwasser-, Nackenhaut- und Geräteproben während der Schlachtung von insgesamt elf Broilerherden gezogen. Zu untersuchende Parameter waren die aerobe mesophile Keimzahl sowie die Anzahl an *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. Bestätigte Isolate wurden durch Sequenzierung des *flaA*-Gens (*Campylobacter* spp.) bzw. durch Makrorestriktionsanalyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (*Salmonella* spp.) auf klonale Zusammenhänge untersucht. Das Ziel war es, den Einfluss unterschiedlicher Betriebsstrukturen der Schlachthöfe auf die Kreuzkontamination der Hähnchenkarkassen zu überprüfen.

Unterschiede zwischen Studien, die Hähnchenkarkassen während der Schlachtung beproben, können auf unterschiedlichen Probenahme- oder Nachweismethoden beruhen. Untersuchungen, die die Probenahme mittels Karkassenspül- oder Hautprobe direkt verglichen, stellten hinsichtlich der aeroben mesophilen Keimzahlen und der Anzahl an *Enterobacteriaceae* meist nur geringe Unterschiede (<0,5 log KbE) zwischen den beiden Probenahmeverfahren fest (Gill et al., 2005; Zhang et al., 2012; Giombelli et al., 2013). Die Beprobung einer definierten Hautfläche mittels Tupferprobe führte in einigen Studien jedoch zu geringeren oder höheren Keimzahlen als die zuvor genannten Verfahren (Gill et al., 2005; Zhang et al., 2012).

Hinsichtlich des Nachweises von *Salmonella* spp. während der Broilerschlachtung wurden bei der Nackenhautprobe vergleichbare Sensitivitäten wie bei der Karkassenspülprobe nachgewiesen (Giombelli et al., 2013; Cox et al., 2014). Jørgensen et al. (2002) vermuteten, dass die Erfassung von tiefer in der Haut befindlichen Keimen bei der destruktiven Probenahme oder eine unterschiedliche Hintergrundflora die Nachweisraten beeinflussen könnten. Die Autoren wiesen keine Unterschiede in der Sensitivität zwischen der Nackenhaut- und Karkassenspülprobe für den Nachweis von *Campylobacter* spp. bei frischen Hähnchenkarkassen aus dem Handel nach, jedoch wurden höhere *Campylobacter*-Keimzahlen in den Spülproben nachgewiesen (Jørgensen et al., 2002).

In der vorliegenden Studie wurde für die Quantifizierung von *Salmonella* und *Campylobacter* jeweils eine MPN-Methode mit anschließendem PCR-Nachweis benutzt. Der Vorteil einer MPN-Methode liegt darin, dass bereits geringe Keimzahlen in Lebensmitteln aufgrund des durchgeführten Anreicherungs-schritts detektiert werden können. Zudem können subletal geschädigte Zellen wiederbelebt werden (Malorny et al., 2008). In Untersuchungen von Scherer (2007) wurden nur geringe Unterschiede zwischen den *Campylobacter*-Keimzahlen nach einer MPN-Methode im Vergleich zu dem direkten Ausspateln bei Hähnchenproben festgestellt.

### 6.1 Allgemeine mikrobiologische Parameter

Die aeroben mesophilen Keimzahlen der Brühwasserproben lagen in Betrieb A zwischen 4,2 und 5,8 log KbE/ml (Median log 5,0 KbE/ml) und in Betrieb B zwischen 5,7 und 6,2 log KbE/ml (Median log 6,0 KbE/ml). Ähnlich hohe mittlere aerobe mesophile Keimzahlen wurden auch in anderen Studien bei einer vergleichbaren Brühtemperatur von etwa 53 °C festgestellt (Geornaras et al., 1995; Göksoy et al., 2004; Zweifel et al., 2015). Obwohl der Median der aeroben mesophilen Keimzahlen der Brühwasserproben in Betrieb B um etwa eine log-Stufe höher lag als in Betrieb A, führte dies nicht zu höheren Keimzahlen bei den Karkassen nach dem Rupfen: Der Median lag in Betrieb A bei 4,9 log KbE/ml und in Betrieb B bei 4,7 log KbE/ml. Die Werte der aeroben mesophilen Keimzahlen der Nackenhautproben nach dem Rupfen waren in dieser Studie in etwa so hoch wie in Untersuchungen von Berrang und Dickens (2000), Svobodova et al. (2012) und Zweifel et al. (2015).

In späteren Schritten des Produktionsprozesses zeigten sich Unterschiede zwischen den Betrieben in Abhängigkeit von der Prozessstufe. Nach der Eviszeration nahm der Median der aeroben mesophilen Keimzahlen in Betrieb A um etwa 0,4 log-Stufen ab und in Betrieb B um etwa 0,3 log-Stufen zu. Während sich die Medianwerte der aeroben mesophilen Keimzahlen nach dem Innen- und Außenwäscher und nach dem Kühlen in Betrieb A nur wenig änderten (<0,2 log KbE/g), kam es in Betrieb B zu Reduktionen um etwa 1,3 log-Stufen nach dem Waschen und etwa 0,4 log-Stufen nach dem Kühlen der Karkassen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus anderen Studien, in denen gezeigt wurde, dass die aeroben mesophilen Keimzahlen zum Ende des Schlachtprozesses je nach Betrieb weiterhin abnehmen oder sich nur noch wenig ändern (vgl. Abb. 2). Besonders auffallend ist jedoch die große Reduktion um etwa 1,3 log-Stufen nach dem Innen- und Außenwäscher in Betrieb B. In anderen Studien wurden Reduktionen bis ca. 0,9 log-Stufen durch das finale Waschen der Karkassen vor dem Kühlen beobachtet (Berrang und Dickens, 2000; Northcutt et al., 2003b; Göksoy et al., 2004; Matias et al., 2010). Obwohl in den Studien teilweise Chlor in das Waschwasser zugesetzt wurde, war die Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahlen nicht so groß wie in Betrieb B in der vorliegenden Studie. Möglicherweise spielt

hierbei die Menge an oberflächlich anhaftendem organischen Material und der daran gebundenen aeroben mesophilen Keime eine Rolle, die bereits durch frühere Waschprozesse – nach dem Rupfen oder während der Eviszeration – abgewaschen werden könnten (Gill und Landers, 2003; Gill et al., 2006). Den Autoren zufolge könnte der Innen- und Außenwäscher nur noch einen geringeren Reduktionseffekt erzielen, weil im Gewebe fest anhaftende Keime nicht entfernt werden (Gill und Landers, 2003; Gill et al., 2006). Für diese Theorie spricht, dass in Betrieb A ein Zusatzaußenwäscher nach dem Rupfen installiert war, und dass es in diesem Betrieb nach der Eviszeration zu einer Reduktion der aeroben mesophilen Keimzahlen kam, während nach dem Innen- und Außenwäscher sich die Keimzahlen kaum änderten.

Die Änderung der Anzahl an *Enterobacteriaceae* im Schlachtverlauf in Abhängigkeit von der Prozessstufe folgte in beiden Betrieben einem ähnlichen Muster wie die Änderung der aeroben mesophilen Keimzahlen, war aber weniger stark ausgeprägt. In Betrieb B wurden höhere *Enterobacteriaceae*-Zahlen in den Brühwasserproben ermittelt als in Betrieb A (Median etwa 2,3 bzw. 3,9 log KbE/ml). Dies zeigte sich jedoch nicht in höheren *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen bei den Karkassen nach dem Rupfen – in Betrieb A lag der Medianwert bei etwa 3,9 log KbE/g Nackenhaut und in Betrieb B bei etwa 3,7 log KbE/g Nackenhaut. Die in der vorliegenden Studie ermittelten *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen sind ähnlich hoch wie in anderen Studien (Geornaras et al., 1995; Göksoy et al., 2004; Zweifel et al., 2015). Die einzigen signifikanten Änderungen der Keimzahlen in den Nackenhautproben im Schlachtverlauf erfolgten in Betrieb A nach der Eviszeration und in Betrieb B nach dem Kühlen. Das Waschen hatte in Betrieb B einen geringeren Einfluss auf die *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen als auf die aeroben mesophilen Keimzahlen: Der Median der *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen nahm nach dem Waschen um etwa 0,3 log-Stufen ab. Während viele Studien über eine Abnahme der *Enterobacteriaceae*-Zahlen nach dem Waschen berichteten, war diese - wie auch in der vorliegenden Studie - oft geringer ausgeprägt als die Abnahme der aeroben mesophilen Keimzahlen, und vom untersuchten Schlachtbetrieb abhängig (vgl. Abb. 2 und Abb. 3).

### **6.2 *Salmonella* spp.**

Der Nachweis von *Salmonella* spp. während der Schlachtung war vom Ergebnis der Kotuntersuchung im Mastbetrieb abhängig. Nur bei im Mastbetrieb *Salmonella*-positiven Broilerherden wurden auch *Salmonella* während der Schlachtung nachgewiesen. Der Anteil an *Salmonella*-positiven Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben lag bei den positiven Herden in Betrieb A insgesamt niedriger als bei den positiven Herden in Betrieb B (Betrieb A: 30,4 %; Betrieb B: 87,5 %). Bei einer Herde in Betrieb A wurden keine Salmonellen in den Blinddarmproben nachgewiesen, obwohl die Brühwasser- und

Nackenhautproben teilweise positiv waren (vgl. Tab. 30). Diese Befunde können möglicherweise durch eine geringere Innenherdenprävalenz (Anteil positiver Blinddarmproben) bei den untersuchten Herden in Betrieb A erklärbar sein. Da jedoch nur zwei Herden pro Betrieb Salmonellen aufwiesen und die Anzahl der untersuchten Blinddarmproben mit  $n=5$  je Herde und Probenahmestelle niedrig lagen, kann dies nur vermutet werden. In früheren Studien wurde gezeigt, dass der Nachweis von Salmonellen im Mastbetrieb oder in den Blinddärmen einer Herde mit einem Risiko für die Kontamination von Broilerkarkassen während der Schlachtung assoziiert ist (Fluckey et al., 2003; Arsenault et al., 2007b; Volkova et al., 2010; Berghaus et al., 2013).

Die Keimzahl von *Salmonella* spp. lag in dieser Studie auf einem niedrigen Niveau: Die MPN-Werte der *Salmonella*-positiven Proben lagen zwischen 0,14 und 260 (Betrieb A) bzw. zwischen 0,14 und 470 (Betrieb B) *Salmonella/g* bzw. *Salmonella/ml* Probe (vgl. Tab. 31). Ähnlich niedrige mittlere Werte von  $<10^3$  *Salmonella* auf Broilerkarkassen wurden zuvor in Studien mittels eines MPN-Verfahrens nachgewiesen (Brichta-Harhay et al., 2008; Hue et al., 2011a; Berghaus et al., 2013). Berghaus et al. (2013) zeigten, dass die *Salmonella*-Prävalenz und die *Salmonella*-Keimzahl auf den Karkassen im Laufe der Schlachtung abnimmt. Trotz der geringen Salmonellennachweisrate in der vorliegenden Studie deuten die Ergebnisse auch auf eine Abnahme der Kontaminationen zum Ende der Schlachtung hin. So war der Anteil positiver Proben in Betrieb A nach dem Rupfen und nach der Eviszierung höher als nach dem Waschen und nach dem Kühlen (vgl. Tab. 30). Insbesondere nach dem Kühlen waren die ermittelten MPN-Werte niedriger als bei früheren Prozessstufen (vgl. Tab. 31).

Die Typisierung der *Salmonella*-Isolate ergab bei zwei Herden in Betrieb A den Serotyp *S. Infantis* und bei zwei Herden in Betrieb B den Serotyp *S. Paratyphi B* (d-Tartrat-positive Variante). Beide Serovaren gehörten im Jahr 2013 zu den zehn am häufigsten in Hähnchenfleisch gemeldeten Serovaren in der EU (EFSA und ECDC, 2015). Die Analyse mittels PFGE zeigte, dass es sich bei den Serotypen um jeweils klonal eng verwandte Genotypen handelte. Das PFGE-Profil der *S. Infantis*-Isolate ist nach Vergleich mit der Publikation von Hauser et al. (2012) dem Pulsfeldtyp 24 zuzuordnen, der bisher aus einer porcinen Lymphknotenprobe in Deutschland isoliert wurde (Hauser et al., 2012). Die *S. Paratyphi B*-Isolate konnten nach der Publikation von Toboldt et al. (2012) der Profil-Nr. 61 zugeordnet werden. Dieser wurde bisher in einem Humanisolat beschrieben (Toboldt et al., 2012).

Dass identische Genotypen in beiden Betrieben sowohl in den Blinddarm- als auch in den Brühwasser- und auf den Nackenhautproben nachgewiesen wurden, weist auf eine

Kontamination durch die jeweils geschlachtete Herde hin. Auch die Tatsache, dass Salmonellen nur bei Herden nachgewiesen wurden, die bereits im Mastbetrieb *Salmonella* positiv waren, spricht dafür, dass Kreuzkontaminationen durch vorher geschlachtete Herden bei den in dieser Studie untersuchten Herden nicht vorkamen. In anderen Studien konnten Kreuzkontaminationen durch vorher geschlachtete Herden mittels Genotypisierung nachgewiesen werden (Olsen et al., 2003; Rasschaert et al., 2007a; Rasschaert et al., 2008). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der vorliegenden Studie wiesen Rasschaert et al. (2007) mehrere verschiedene PFGE-Genotypen und Serotypen bei ein und derselben geschlachteten Herde nach; die Autoren wiesen auch teilweise dieselben Sero- und Genotypen vor der Schlachtung auf den Schlachtgeräten und auf den Karkassen während der Schlachtung nach (Rasschaert et al., 2007a). Dass in der vorliegenden Studie maximal ein Genotyp pro Herde vorkam, könnte auf die abnehmende *Salmonella*-Prävalenz in Masthähnchenherden in den letzten Jahren zurückzuführen sein (EFSA und ECDC, 2015). In dieser Studie wurden auch keine Salmonellen auf den Schlachtgeräten direkt nach der Schlachtung einer positiven Herde nachgewiesen. Dies könnte durch eine geringe *Salmonella*-Belastung in den untersuchten Herden, aber auch durch die Beprobung einer relativ kleinen Fläche der Schlachtgeräte mittels eines Wattestabs (Cary-Blair-Tupfer) erklärbar sein (vgl. Kap. 4.1).

### **6.3 *Campylobacter* spp.**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass Kontaminationen der Schlachtkörper mit *Campylobacter* spp. sowohl durch die Schlachtung von blinddarmpositiven Broilerherden als auch durch Kreuzkontaminationen über kontaminierte Schlachtgeräte zustande kamen. Bei 8 von 11 der in dieser Studie untersuchten Herden wurden *Campylobacter* spp. in den Blinddarmproben nachgewiesen. Diese Herden wiesen *Campylobacter* spp. mit einem hohen Anteil von meist 100 % in den Nackenhautproben auf. Insgesamt waren 65,4 % (36/55) der Blinddarmproben und 80 % (32/40) der nach der Kühlung untersuchten Nackenhaut-Poolproben *Campylobacter* spp. positiv. Damit liegt die *Campylobacter*-Prävalenz bei der Stichprobe in dieser Studie höher als bei der Prävalenzuntersuchung im Rahmen des Zoonosenmonitorings im Jahr 2013 in Deutschland (BVL, 2015).

Lediglich eine der untersuchten Herden – die Herde A2 in Betrieb A – war in allen gezogenen Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben *Campylobacter*-negativ. Dies könnte daran liegen, dass vor dieser Herde eine oder mehrere *Campylobacter*-negative Herden geschlachtet wurden. Die These kann jedoch nicht mit Sicherheit bestätigt werden, da keine Proben von vorausgegangenen Herden bei der Herde A2 gezogen wurden. Reich et al. (2008) zeigten, dass vor der Schlachtung einer in Karkassenproben *Campylobacter*

negativen Herde mehrere blinddarmnegative Herden geschlachtet wurden. Weiterhin dokumentierten sie, dass eine blinddarmnegative Herde eine höhere *Campylobacter*-Prävalenz der Karkassen aufwies, wenn zuvor eine blinddarmpositive Herde geschlachtet wurde (Reich et al., 2008). Eine andere Erklärung für die negativen Ergebnisse der Herde A2 könnte sein, dass die Kreuzkontamination einer negativen Herde zeitabhängig ist. So wurden in Untersuchungen von Elvers et al. (2011) nur die ersten Tiere einer negativen Herde mit *Campylobacter* kontaminiert; nach Schlachtung von etwa 5.000 Tieren einer negativen Herde wurden keine *Campylobacter* spp. mehr auf den Karkassen detektiert (Elvers et al., 2011). In der vorliegenden Studie erfolgte die Probenahme bei der Herde A2 mindestens 10 Minuten nach Schlachtung des ersten Tieres der Herde, sodass bei einer Schlachtgeschwindigkeit von 12.000 Tieren/h ab Beginn der Probenahme bereits mindestens 2.000 Tiere der Herde geschlachtet wurden.

In Betrieb B wurden bei zwei Herden (Herde B1 und B3) in den Blinddarmproben keine *Campylobacter* nachgewiesen, jedoch waren die Brühwasser- und Nackenhautproben *Campylobacter* positiv. Dabei waren bei der Herde B3 mehrere Nackenhautproben - insbesondere nach dem Rupfen, Waschen und Kühlen – *Campylobacter*-negativ bzw. unterhalb der Nachweisgrenze (vgl. Tab. 33). Die Kontaminationen dieser Herden kamen möglicherweise durch Kreuzkontaminationen über vorher geschlachtete positive Herden zustande. Durch die niedrige Probenzahl von n=5 Blinddarmproben je Herde kann jedoch die Möglichkeit der falsch-negativen Identifizierung der Herden B1 und B3 nicht ausgeschlossen werden.

Die *Campylobacter*-Prävalenzen in den Brühwasserproben variierten in Abhängigkeit von der untersuchten Herde und korrelierten in beiden Betrieben nur schlecht mit den Ergebnissen der Blinddarmproben (vgl. Tab. 33). In beiden Betrieben wurden *Campylobacter*-Keimzahlen bis etwa 4,4 log MPN/ml ermittelt, jedoch lagen in Betrieb A deutlich mehr Proben unterhalb der Nachweisgrenze als in Betrieb B. Möglicherweise spielte hier der Typ des Brühsystems eine Rolle: In Betrieb A wurde das Brühwasser in Gegenrichtung zu den Karkassen geleitet (vgl. Tab. 14). Dies könnte auch eine Ursache für die niedrigeren aeroben mesophilen Keimzahlen und *Enterobacteriaceae*-Zahlen des Brühwassers in Betrieb A sein. In früheren Studien konnte die mikrobielle Belastung des Brühwassers gesenkt werden, indem mehrere Brühtanks im Gegenstromprinzip betrieben wurden und indem die Brühwassertemperatur erhöht wurde (Waldroup et al., 1993; Cason et al., 1999; Cason und Hinton, 2006; Lehner et al., 2014).

Der Median der MPN-Werte in den Blinddarmproben von *Campylobacter*-positiven Herden lag in Betrieb A bei etwa 6,4 und in Betrieb B bei etwa 5,9 log MPN/g, wobei viele Proben

*Campylobacter*-Keimzahlen bis zur oberen Nachweisgrenze von etwa 7,4 log MPN/g aufwiesen. In der Literatur wurde über mittlere *Campylobacter*-Keimzahlen von etwa 4 bis 11 log MPN/g im Caecuminhalt bei *Campylobacter*-positiven Herden berichtet (Allen et al., 2007; Reich et al., 2008; Hue et al., 2011b; Sasaki et al., 2012; Seliwiorstow et al., 2015). Hue et al. (2011b) stellten fest, dass Karkassen von blinddarmpositiven Herden signifikant höhere Konzentrationen an *Campylobacter* spp. auf den Karkassen aufwiesen als Karkassen von blinddarmnegativen Herden. Auch in der vorliegenden Studie wurden höhere Keimzahlen auf den Karkassen bei den blinddarmpositiven Herden nachgewiesen (vgl. Abb. 14). Während die Medianwerte in Betrieb A nach dem Rupfen und nach dem Kühlen mit etwa 3,4 log MPN/g am höchsten waren, wurden in Betrieb B die höchsten Medianwerte von 3,4 log MPN/g nach der Eviszation ermittelt (vgl. Tab. 40). Die in dieser Studie ermittelten *Campylobacter*-Keimzahlen in den Nackenhautproben lagen in einem ähnlichen Bereich wie in einer Grundlagenstudie des Bundesinstituts für Risikobewertung aus dem Jahr 2009, bei der etwa 39 % der Karkassen Keimzahlen zwischen 100 und 1.000 KbE/g aufwiesen (BfR, 2009). Die Unterschiede in der Anzahl an *Campylobacter* spp. zwischen den verschiedenen Probenahmestellen waren – im Gegensatz zu den aeroben mesophilen Keimzahlen und der Anzahl an *Enterobacteriaceae* – in beiden untersuchten Schlachtbetrieben nicht signifikant. In der Literatur wurde nach der Eviszation über zunehmende, abnehmende oder gleichbleibende Anzahlen an *Campylobacter* spp. auf Broilerkarkassen berichtet. Nach dem Innen- und Außenwäscher sowie nach dem Kühlen der Karkassen nahmen die *Campylobacter*-Keimzahlen meistens ab (vgl. Tab. 5).

Die Zu- oder Abnahmen der Medianwerte der *Campylobacter*-Keimzahlen an den einzelnen Probenahmestellen folgten nur teilweise dem Verlauf der aeroben mesophilen Keimzahlen und den *Enterobacteriaceae*-Zahlen. So nahmen nach der Eviszation alle untersuchten mikrobiologischen Parameter in Betrieb A ab und in Betrieb B zu. Dies könnte daran liegen, dass in Betrieb B häufiger Tiere unterschiedlichen Alters geschlachtet wurden und die Schlachtgeräte dadurch an die verschiedenen Tiergrößen nicht optimal angepasst waren (vgl. Tab. 14; Rosenquist et al., 2006). Die Änderungen nach dem Waschen und nach dem Kühlen waren bezüglich der untersuchten mikrobiologischen Parameter jedoch nicht einheitlich. Verschiedene Studien kamen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl an Indikatorkeimen und pathogenen Bakterien auf Geflügelkarkassen zu unterschiedlichen Ergebnissen (vgl. Kap. 2.1.3). Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass ein solcher Zusammenhang für bestimmte Schritte der Schlachtung (z.B. Eviszation) existieren könnte, für andere Prozessschritte (z.B. Kühlen) jedoch nicht. Möglicherweise spielen hierbei Unterschiede zwischen verschiedenen Keimen oder Keimgruppen in der Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen eine Rolle. In

bisherigen Studien wurden Hinweise dafür gefunden, dass bestimmte *Campylobacter*-Stämme durch stärkere Biofilmbildung oder durch Resistenz gegenüber Temperatureinflüssen in der Schlachthofumgebung besser überleben könnten (Alter et al., 2005; Kudirkienė et al., 2012).

In der vorliegenden Studie wurden die Spezies *C. jejuni* in 98,8 % und die Spezies *C. coli* in 11,9 % der *Campylobacter*-positiven Proben mittels Multiplex-PCR detektiert. Bei 10 von 11 der untersuchten Herden wurden *C. jejuni* nachgewiesen, während nur zwei Herden zusätzlich *C. coli* aufwiesen. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen aus anderen Studien, bei denen *C. jejuni* häufiger als *C. coli* und *C. lari* in den Blinddärmen und auf den Karkassen von Broilern nachgewiesen wurden (Rasschaert et al., 2007b; BfR, 2009; Reich et al., 2008; Hue et al., 2011b; EFSA und ECDC, 2015). Bei einer in der vorliegenden Studie untersuchten Herde (Herde A4) wurde *C. coli* mit einem hohen Anteil von 75,7 % der positiven Proben in den Blinddarm-, Nackenhaut-, und Geräteproben detektiert, während die Brühwasserproben *Campylobacter*-negativ waren. Diese Befunde deuten darauf hin, dass es zur fäkalen Kontamination und Kreuzkontamination mit *C. coli* über die Schlachtgeräte kam.

Bei den an unterschiedlichen Tagen geschlachteten und einzeln beprobten Herden dominierte unabhängig vom untersuchten Schlachtbetrieb jeweils ein *flaA*-Sequenztyp (*flaA*-Typ 321, 264, 34 oder 49). Dieser Typ war an mehreren Probenahmestellen entlang der gesamten Schlachtkette nachweisbar. Bei den Herden A1, A3 und B2 wurde der dominante *flaA*-Typ in den Blinddarmproben und an allen vier Nackenhautprobenahmestellen nachgewiesen. Auch in den nach der Schlachtung der Herde A3 entnommenen Brühwasser- und Geräteproben wurde der bei dieser Herde dominierende *flaA*-Typ 264 detektiert. Die nicht-dominanten *flaA*-Typen traten nur sporadisch auf und wurden aus den Nackenhaut- und Geräteproben, aber nicht aus den Blinddärmen der jeweiligen Herden isoliert. In der vorliegenden Studie wurden alle dominierenden Genotypen auch nach der Kühlung auf den Karkassen nachgewiesen, wie es auch in einer Studie von Klein et al. (2007) in einem deutschen Schlachtbetrieb der Fall war. Diese Genotypen könnten potentiell im Endprodukt vorkommen und damit bis zum Verbraucher gelangen (Klein et al., 2007).

In der Literatur, wie auch in der vorliegenden Studie, wurden meistens ein bis drei verschiedene *Campylobacter*-Genotypen bei einer Broilerherde vorgefunden (Newell et al., 2001; Ellerbroek et al., 2010; Elvers et al., 2011; Kudirkienė et al., 2011). Die eigenen Untersuchungen decken sich mit den Ergebnissen aus der Studie von Elvers et al. (2011), bei der die auf den Karkassen dominierenden *Campylobacter*-Stämme auch in den Blinddärmen der geschlachteten Herde identifiziert wurden. Die Autoren benutzten eine eigens entwickelte Oligonukleotid-Sonden-Methode in Kombination mit Kolonie-

Hybridisierung, um spezifische *Campylobacter*-Stämme während der Schlachtung zu verfolgen und zu quantifizieren. Hierbei zeigte sich, dass besonders die zuerst geschlachteten Tiere einer *Campylobacter*-negativen Herde, die nach einer *Campylobacter*-positiven Herde geschlachtet wurden, häufig mit *Campylobacter*-Stämmen kontaminiert waren, die bei der zuvor geschlachteten positiven Herde nicht auftraten (Elvers et al., 2011).

In der vorliegenden Studie wurden *Campylobacter* spp. mit einem hohen Anteil positiver Proben auf den Schlachtgeräten nach der Schlachtung von *Campylobacter*-positiven Herden nachgewiesen (vgl. Tab. 34). Die Tupferprobenahme erfolgte an den aus Vollgummi bestehenden Rupffingern an der Rupfanlage sowie an Edelstahlflächen bei Eviszerations- und Nachinspektionsmaschinen im Bereich der Bratfertigungslinie. Dabei hatten alle Probenahmepunkte direkten Kontakt zu den Tierkörpern und dienten damit potentiell als Kreuzkontaminationsquelle. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass *C. jejuni* auf Edelstahl- oder Polypropylen-Oberflächen in den ersten 30 Minuten nach Inokulation eine Reduktion von etwa 3,0 log-Stufen erfährt (Kusumaningrum et al., 2003; Cools et al., 2005). Da die Tupferprobenahme in der vorliegenden Studie nur wenige Minuten nach der Schlachtung begann, könnte dies die hohe Nachweisrate erklären. Außerdem waren die Schlachtgeräte zum Zeitpunkt der Probenahme noch sichtbar feucht. Dies könnte das Überleben von *Campylobacter* begünstigt haben, da diese sehr empfindlich gegenüber Trockenheit sind (Corry und Atabay, 2001). Der am häufigsten auf den Schlachtgeräten isolierte *flaA*-Typ war auch der jeweils dominierende Typ bei der zuvor geschlachteten Herde (vgl. Tab. 35 und Tab. 37). Daher könnte anhand der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen vermutet werden, dass eine *Campylobacter*-negative Herde hauptsächlich durch *Campylobacter*-Stämme aus dem Darm einer zuvor geschlachteten positiven Herde kontaminiert wird, wenn die Kontamination durch direkten Kontakt mit den Schlachtanlagen erfolgt. Jedoch müssen auch andere potentielle Kreuzkontaminationsquellen berücksichtigt werden. So wurden Transportkäfige, Prozesswasser, Aerosole, Handschuhe des Schlachthofpersonals sowie Oberflächen im Bereich der Zerlegung und Weiterverarbeitung als Quellen für Kreuzkontaminationen mit *Campylobacter* spp. beschrieben (Newell et al., 2001; Cools et al., 2005; Allen et al., 2007; Ellerbroek et al., 2010; Perko-Mäkelä et al., 2011; Melero et al., 2012).

Ein Ziel dieser Studie war es, die Kreuzkontamination zwischen drei hintereinander geschlachteten Herden zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass drei gleiche *C. jejuni*- *flaA*-Typen (*flaA*-Typ 49, 117 und 105) bei allen drei Herden auf den Karkassen nach der Eviszierung nachweisbar waren. Alle drei Herden wiesen auch *C. jejuni* in den Blinddärmen auf. Allerdings gelang es nur bei zwei Blinddarmproben aus der ersten Herde Reinkulturen von *C. jejuni* zu isolieren, die für eine anschließende *flaA*-Typisierung notwendig ist. Aus

diesen Proben wurden die *flaA*-Typen 49 und 117 isoliert. Somit lässt sich nicht feststellen, welche *flaA*-Typen bereits vor der Schlachtung in der zweiten und dritten Herde vertreten waren. Auffallend war, dass der Anteil bestimmter *flaA*-Typen zwischen den Herden variierte (vgl. Tab. 36). In der ersten Herde wurden die im Blinddarm nachgewiesenen *flaA*-Typen 49 und 117 auch am häufigsten auf den Karkassen nachgewiesen, während bei der zweiten und dritten Herde der *flaA*-Typ 105 dominierte. Mehrere Erklärungen für diese Befunde müssen in Betracht gezogen werden. Als Erstes besteht die Möglichkeit, dass die dominierenden *flaA*-Typen in höherer Zahl auf den Karkassen vorkamen und deswegen häufiger nachgewiesen wurden. Möglicherweise ist die Zunahme des *flaA*-Typs 105 bei der zweiten und dritten Herde damit zu erklären, dass die *flaA*-Typen 49 und 117 im Blinddarm dieser Herden nicht mehr vorkamen. In diesem Fall könnte die Kontamination der Karkassen mit den jeweils nicht-dominierenden *flaA*-Typen durch Kreuzkontamination zwischen den Herden entstanden sein. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die Kontamination der drei Herden mit identischen Genotypen bereits in der Primärproduktion oder durch den Transport über Transportkäfige geschah (Slader et al., 2002). Für diese These spricht, dass teilweise dieselben Genotypen (*flaA*-Typ 49 und 34) bei an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Probenziehungen nachgewiesen wurden. Drittens muss berücksichtigt werden, dass durch die in der vorliegenden Studie benutzte selektive Anreicherung in Preston-Bouillon bestimmte *Campylobacter*-Stämme bevorzugt werden könnten. So wurden in einer Studie von Newell et al. (2001) bestimmte *Campylobacter*-Stämme nur nach dem direkten Ausstrich, nicht aber nach der Anreicherung detektiert (Newell et al., 2001).

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte Genotypen den Schlachtprozess besser überleben können als andere, weil sie widerstandsfähiger gegenüber Stressoren sind (Newell et al., 2001; Alter et al., 2005; Klein et al., 2007; Kudirkienė et al., 2011). So können bestimmte *Campylobacter*-Stämme die Reinigung und Desinfektion überleben und noch am nächsten Tag zur Kontamination der Karkassen führen (Peyrat et al., 2008; Kudirkienė et al., 2011). In der vorliegenden Studie wurden keine Hinweise auf das bessere Überleben bestimmter Genotypen gefunden. Im Gegensatz zu anderen Studien wurde in der vorliegenden Studie die jeweils an einem Tag zuletzt geschlachtete Herde beprobt, sodass keine Aussage über das langfristige Überleben von *Campylobacter* im Schlachthof und dessen Bedeutung für die Kontamination der Karkassen zu Beginn des Tages gemacht werden kann.

### 6.4 Empfehlungen und Ausblick

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Schlachthöfe mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen Unterschiede bei der mikrobiellen Kontamination von Broilerkarkassen zeigen. So können einzelne Prozessschritte im Bereich der Eviszierung, des Innen-

Außenwäschers und des Kühlens die mikrobielle Kontamination je nach Schlachtbetrieb negativ oder positiv beeinflussen. Vor allem durch Optimierung der Technologie im Bereich der Eviszeration könnte die mikrobielle Belastung verringert werden. In der vorliegenden Studie wurden mehrere Punkte entlang der Schlachtung identifiziert, die als Quelle für Kreuzkontamination dienen können. Das Brühwasser, die Rupffinger, der Kloakenschneider, der Körperhöhlenöffner, der Ausnehmer, der Nackenhautschneider und der Vakuumsauger waren mit *Campylobacter* spp. kontaminiert. Die *flaA*-Typisierung zeigte, dass dieselben Genotypen, die auf den Schlachtgeräten nachgewiesen wurden, bei zuvor geschlachteten Herden im Blinddarm und auf den Karkassen vorkamen. Durch Optimierung der Schlachtgeräte könnte die mikrobielle Kontamination des Hähnchenfleisches verringert werden. Dies könnte durch eine bessere Adaptation der Schlachtgeräte an unterschiedliche Tiergrößen geschehen, um fäkale Kontaminationen zu reduzieren (Rosenquist et al., 2006). Kreuzkontaminationen könnten möglicherweise durch eine automatisierte Reinigung und Desinfektion der Schlachtgeräte an kritischen Punkten reduziert werden. Hierfür wären insbesondere im Bereich der Eviszeration neue Verfahren zur Dekontamination der Schlachtgeräte erforderlich. Zudem sollten Schlachtgeräte so beschaffen sein, dass eine möglichst geringe Kontaktfläche zu den Schlachtkörpern besteht. Welche weiteren herden- oder schlachtanlagenspezifischen Faktoren einen Einfluss auf die Kontamination haben, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden. Unterschiedliche technologische Lösungen im Bereich des Brühens, des Rupfens und der Eviszeration sollten untersucht und hinsichtlich des Kreuzkontaminationsrisikos verglichen werden.

## 7 Zusammenfassung

**Titel: Mikrobielle Kontamination von Schlachtkörpern bei zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen sowie Analyse von Quellen für Kreuzkontaminationen**

Die Broilerschlachtung stellt ein Risiko für die Kontamination des Hähnchenfleisches mit humanpathogener *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. dar. Bisher ist noch nicht hinreichend geklärt, welche schlachthofspezifischen Faktoren diese Kontamination beeinflussen. In der vorliegenden Studie wurde die Kontamination der Schlachtkörper bei zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben mit unterschiedlichen Betriebsstrukturen untersucht. Das Ziel war es, Kreuzkontaminationsquellen innerhalb einer Herde und zwischen hintereinander geschlachteten Herden zu identifizieren.

Im Rahmen der Studie wurden Nackenhaut-, Brühwasser-, Blinddarm- und Geräteproben während und nach der Schlachtung von insgesamt 11 Broilerherden entnommen und untersucht. Die Entnahme der Nackenhautproben erfolgte an vier verschiedenen Stufen der Schlachtung: Direkt nach dem Rupfen, nach der Eviszation, nach dem Innen-Außenwäscher und nach der Kühlung. Als allgemeine Hygieneparameter wurden die aerobe mesophile Keimzahl und die Anzahl an *Enterobacteriaceae* der Nackenhaut- und Brühwasserproben bestimmt. Für jede Nackenhaut-, Brühwasser- und Blinddarmprobe wurde eine semiquantitative Bestimmung der *Campylobacter*-Zahl (modifiziert nach ISO 10272-3:2010) und *Salmonella*-Zahl (ISO/TS 6579-2:2012 (E)) durchgeführt. Bei den Tupferproben der Schlachtgeräte erfolgte ein qualitativer Nachweis von *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. Bestätigte Isolate wurden durch Sequenzierung des *flaA*-Gens (*Campylobacter* spp.) bzw. durch eine Makrorestriktionsanalyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (*Salmonella* spp.) auf klonale Zusammenhänge untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Kontamination der Schlachtkörper besonders nach der Schlachtung von *Salmonella*- oder *Campylobacter*-positiven Broilerherden stattfand. In beiden Betrieben wurden insgesamt niedrige *Salmonella*-Zahlen von 0,14 bis 260 MPN/g (Betrieb A) bzw. von 0,14 bis 470 MPN/g (Betrieb B) in den positiven Blinddarm- und Nackenhautproben ermittelt. Der Median der MPN-Werte von *Campylobacter* spp. in den Nackenhautproben betrug 3,4 log MPN/g in Betrieb A und 2,4 log MPN/g in Betrieb B. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Probenahmestellen in der Anzahl an *Campylobacter* spp. waren statistisch nicht signifikant. Abhängig vom Schlachtbetrieb zeigten die Eviszation, das Waschen und das Kühlen unterschiedliche und

teilweise statistisch signifikante Auswirkungen auf die ermittelten allgemeinen Hygieneparameter.

Innerhalb der einzelnen Probenziehungen wurden jeweils ein *Salmonella*-Serotyp mit übereinstimmendem PFGE-Profil (>95 % Übereinstimmung) bzw. ein bis fünf *Campylobacter flaA*-Typen nachgewiesen. Betriebsunabhängig dominierte meist nur ein *Campylobacter flaA*-Typ oder ein *Salmonella*-Serotyp, der an mehreren Probenahmestellen detektiert wurde. Bei Herden mit einem positiven *Salmonella*- oder *Campylobacter*-Befund im Blinddarm wurden verwandte Genotypen auf den Karkassen nachgewiesen. Durch Beprobung von drei aufeinanderfolgend geschlachteten Herden in Betrieb B wurden teilweise dieselben *Campylobacter flaA*-Typen bei allen drei Herden detektiert. Als potentielle Quellen für Kreuzkontaminationen wurden das Brühwasser, die Rupffinger sowie die Schlachtgeräte im Bereich der Eviszeration identifiziert. Weitere Forschung und technologische Weiterentwicklung im Bereich des Brühens, des Rupfens und der Eviszeration sind nötig, um das Kontaminationsrisiko in der Broilerschlachtung zu reduzieren.

## 8 Summary

### **Title: Microbial contamination of carcasses at two German broiler slaughterhouses with different operating structures and analysis of sources of cross-contamination**

The broiler slaughter poses a risk for the contamination of chicken meat with human pathogenic *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. It is not yet sufficiently clear which slaughterhouse-specific factors influence this contamination. In the present study, the contamination of the carcasses is examined at two German slaughterhouses with different operating structures. The aim was to identify sources for cross-contamination within a flock and between consecutively slaughtered flocks.

In this study, neck skin, scalding water, caecum and slaughter line samples were taken during and after the slaughter of 11 broiler batches. The neck skin samples were collected at four different stages of slaughter: immediately after defeathering, after evisceration, after the inside-outside washer and after cooling of carcasses. As general hygiene parameters the aerobic colony count and the number of *Enterobacteriaceae* of the neck skin and scalding water samples were determined. For each neck skin, scalding water and caecal content sample a semiquantitative determination of *Campylobacter* numbers (modified according to ISO 10272-3:2010) and *Salmonella* numbers (ISO/TS 6579-2: 2012 (E)) was performed. For the swab samples of the slaughter line a qualitative detection of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. was carried out. Confirmed isolates were typed by sequencing the *flaA* gene (*Campylobacter* spp.) or by macrorestriction analysis by Pulsed field gel electrophoresis (*Salmonella* spp.).

The results of the present study indicate that contamination of carcasses occurred especially after the slaughter of *Salmonella*- or *Campylobacter*-positive broiler flocks. In both slaughterhouses low *Salmonella* numbers from 0.14 to 260 MPN/g (slaughterhouse A) or from 0.14 to 470 MPN/g (slaughterhouse B) were detected in the positive caecal content and neck skin samples. The median MPN value of *Campylobacter* spp. in the neck skin samples was 3.4 log MPN/g in slaughterhouse A and 2.4 log MPN/g in slaughterhouse B. The differences between the individual process steps in the number of *Campylobacter* spp. were not statistically significant. Depending on the slaughterhouse the evisceration, washing and chilling process steps showed different and partly significant impact on the general hygiene parameters.

Within each sample drawing one *Salmonella* serotype with matching PFGE profile (> 95% similarity) or one to four *Campylobacter flaA* types were detected. In both slaughterhouses usually only one *Campylobacter flaA* type or *Salmonella* serotype dominated at various

sampling points. In flocks where *Salmonella* or *Campylobacter* were detected in the caecal samples, related genotypes were also detected on the carcasses. By sampling three consecutively slaughtered flocks in slaughterhouse B, the same *Campylobacter flaA* types were partly detected in all three flocks. As potential sources of cross-contamination, the scalding water, the picking fingers and the evisceration equipment were identified. More research and technological development in the process of scalding, defeathering and evisceration is needed to reduce the risk of contamination in broiler slaughter.

## 9 Literaturverzeichnis

Allen, V. M., D. B. Tinker, M. H. Hinton and C. M. Wathes (2003). Dispersal of micro-organisms in commercial defeathering systems. British Poultry Science 44(1): 53-59.

Allen, V. M., S. A. Bull, J. E. L. Corry, G. Domingue, F. Jorgensen, J. A. Frost, R. Whyte, A. Gonzalez, N. Elviss and T. J. Humphrey (2007). *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. International Journal of Food Microbiology 113(1): 54-61.

Allen, V. M., H. Weaver, A. M. Ridley, J. A. Harris, M. Sharma, J. Emery, N. Sparks, M. Lewis and S. Edge (2008). Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. Journal of Food Protection 71(2): 264-270.

Allen, V. M., A. M. Ridley, J. A. Harris, D. G. Newell and L. Powell (2011). Influence of production system on the rate of onset of *Campylobacter* colonization in chicken flocks reared extensively in the United Kingdom. British Poultry Science 52(1): 30-39.

Allos, B. M. (1997). Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome. Journal of Infectious Diseases 176: 125-128.

Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields and D. L. Swerdlow (1999). *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases 5(1): 28-35.

Alter, T., F. Gaull, A. Froeb and K. Fehlhaber (2005). Distribution of *Campylobacter jejuni* strains at different stages of a turkey slaughter line. Food Microbiology 22(4): 345-351.

Alter, T., R. M. Weber, A. Hamedy and G. Glunder (2011). Carry-over of thermophilic *Campylobacter* spp. between sequential and adjacent poultry flocks. Veterinary Microbiology 147(1-2): 90-95.

Anonymous (2003). Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern. Amtsblatt der Europäischen Union L325: 1-15.

Anonymous (2004). Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Union L139: 1-54.

Anonymous (2004). Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. Amtsblatt der Europäischen Union L139: 55-205.

Anonymous (2005). Verordnung (EG) Nr. 183/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Januar 2005 mit Vorschriften für die Futtermittelhygiene. Amtsblatt der Europäischen Union L35: 1-22.

Anonymous (2005). Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Amtsblatt der Europäischen Union L338: 1-26.

Anonymous (2010). Verordnung (EU) Nr. 200/2010 Der Kommission vom 10. März 2010 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf ein Unionsziel zur Senkung der Prävalenz von *Salmonella*-Serotypen bei erwachsenen *Gallus-gallus*-Zuchtherden. Amtsblatt der Europäischen Union L61: 1-9.

Anonymous (2012). Verordnung (EU) Nr. 200/2012 der Kommission vom 8. März 2012 über ein Unionsziel zur Verringerung von *Salmonella enteritidis* und *Salmonella typhimurium* bei Masthähnchenherden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates Amtsblatt der Europäischen Union L71: 1-31.

Anonymous (2012). Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung und zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1099/2009 des Rates (Tierschutzschlachtverordnung - TierSchlV) in der Fassung vom 20. Dezember 2012. Bundesgesetzblatt I: S. 2982.

Anonymous (2014). Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn und bei Puten (Geflügel-Salmonellen-Verordnung - GfISalmoV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Januar 2014 (BGBl. I S. 58) zuletzt geändert durch Artikel 8 der Verordnung vom 29. Dezember 2014 (BGBl. I S. 2481). Bundesgesetzblatt I: S. 58.

Arsenault, J., A. Letellier, S. Quessy and M. Boulianne (2007a). Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec, Canada. Journal of Food Protection 70(8): 1820-1828.

Arsenault, J., A. Letellier, S. Quessy, V. Normand and M. Boulianne (2007b). Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. caecal colonization in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. Preventive Veterinary Medicine 81(4): 250-264.

Bailey, J. S., N. A. Cox and M. E. Berrang (1994). Hatchery-acquired salmonellae in broiler chicks. Poultry Science 73(7): 1153-1157.

Barco, L., S. Belluco, A. Roccato and A. Ricci (2014). *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on poultry carcasses along the slaughter processing line, factors influencing the counts and relationship between visual faecal contamination of carcasses and counts: a review. EFSA supporting publication 2014:EN-636: 1-107.

Bashor, M. P., P. A. Curtis, K. M. Keener, B. W. Sheldon, S. Kathariou and J. A. Osborne (2004). Effects of carcass washers on *Campylobacter* contamination in large broiler processing plants. Poultry Science 83(7): 1232-1239.

Baylis, C. L., S. MacPhee, K. W. Martin, T. J. Humphrey and R. P. Betts (2000). Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. Journal of Applied Microbiology 89(5): 884-891.

Berghaus, R. D., S. G. Thayer, B. F. Law, R. M. Mild, C. L. Hofacre and R. S. Singer (2013). Enumeration of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in Environmental Farm Samples and Processing Plant Carcass Rinses from Commercial Broiler Chicken Flocks. Applied and Environmental Microbiology 79(13): 4106-4114.

Berrang, M. E. and J. A. Dickens (2000). Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. Journal of Applied Poultry Research 9(1): 43-47.

- Berrang, M. E., R. J. Buhr, J. A. Cason and J. A. Dickens (2001). Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. Journal of Food Protection 64(12): 2063-2066.
- Berrang, M. E., D. P. Smith, W. R. Windham and P. W. Feldner (2004). Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. Journal of Food Protection 67(2): 235-238.
- Berrang, M. E., J. S. Bailey, S. F. Altekruse and W. K. Shaw (2008a). Presence and numbers of *Campylobacter*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* determined in broiler carcass rinses from United States processing plants in the hazard analysis and critical control point-based inspection models project. Journal of Applied Poultry Research 17(3): 354-360.
- Berrang, M. E., R. J. Meinersmann, D. P. Smith and H. Zhuang (2008b). The effect of chilling in cold air or ice water on the microbiological quality of broiler carcasses and the population of *Campylobacter*. Poultry Science 87(5): 992-998.
- Berrang, M. E. and J. S. Bailey (2009). On-line brush and spray washers to lower numbers of *Campylobacter* and *Escherichia coli* and presence of *Salmonella* on broiler carcasses during processing. Journal of Applied Poultry Research 18(1): 74-78.
- BfR (2009). Grundlagenstudie zum Vorkommen von *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. in Schlachtkörpern von Masthähnchen vorgelegt. Stellungnahme Nr. 010/2010 des BfR vom 16. Juli 2009.
- Bilgili, S. F., A. L. Waldroup, D. Zelenka and J. E. Marion (2002). Visible ingesta on prechill carcasses does not affect the microbiological quality of broiler carcasses after immersion chilling. Journal of Applied Poultry Research 11(3): 233-238.
- Birkhold, S. G. and A. R. Sams (1993). Fragmentation, tenderness, and post-mortem metabolism of early-harvested broiler breast fillets from carcasses treated with electrical stimulation and muscle tensioning. Poultry Science 72(3): 577-582.
- Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes and M. J. Blaser (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. Journal of Infectious Diseases 157(3): 472-479.
- Blaser, M. J., D. N. Taylor and R. A. Feldman (1983). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiologic Reviews 5: 157-176.
- BLE (2014). Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2014. Münster: Landwirtschaftsverlag GmbH Münster-Hiltrup. 640 S.
- Blood, R. M. and B. Jarvis (1974). Chilling of poultry: the effects of process parameters on the level of bacteria in spin-chiller waters. Journal of Food Technology 9(2): 157-169.
- Bolder, N. M. (2007). Microbial challenges of poultry meat production. Worlds Poultry Science Journal 63(3): 401-411.
- Bolton, F. J. and D. Coates (1983). A study of the oxygen and carbon dioxide requirements of thermophilic campylobacters. Journal of Clinical Pathology 36(7): 829-834.
- Bolton, F. J., D. Coates and D. N. Hutchinson (1984). The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. Journal of Applied Bacteriology 56(1): 151-157.

- Boysen, L. and H. Rosenquist (2009). Reduction of Thermotolerant *Campylobacter* Species on Broiler Carcasses following Physical Decontamination at Slaughter. Journal of Food Protection 72(3): 497-502.
- Brichta-Harhay, D. M., T. M. Arthur and M. Koohmaraie (2008). Enumeration of *Salmonella* from poultry carcass rinses via direct plating methods. Letters in Applied Microbiology 46(2): 186-191.
- Broman, T., H. Palmgren, S. Bergstrom, M. Sellin, J. Waldenstrom, M. L. Danielsson-Tham and B. Olsen (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. Journal of Clinical Microbiology 40(12): 4594-4602.
- Brune, H. E. and Cunningham, Fe (1971). Review of microbiological aspects of poultry processing. Worlds Poultry Science Journal 27(3): 223-240.
- Bruun, T., G. Sorensen, L. P. Forshell, T. Jensen, K. Nygard, G. Kapperud, B. A. Lindstedt, T. Berglund, A. Wingstrand, R. F. Petersen, L. Muller, C. Kjelso, S. Ivarsson, M. Hjertqvist, S. Lofdahl and S. Ethelberg (2009). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. Euro Surveillance 14(10).
- Bryan, F. L. and M. P. Doyle (1995). Health Risks and Consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Poultry. Journal of Food Protection 58(3): 326-344.
- Buhr, R. J., N. A. Cox, N. J. Stern, M. T. Musgrove, J. L. Wilson and K. L. Hiatt (2002). Recovery of *Campylobacter* from segments of the reproductive tract of broiler breeder hens. Avian Diseases 46(4): 919-924.
- Buhr, R. J., M. E. Berrang and J. A. Cason (2003). Bacterial recovery from breast skin of genetically feathered and featherless broiler carcasses immediately following scalding and picking. Poultry Science 82(10): 1641-1647.
- Buncic, S. and J. Sofos (2012). Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. Food Research International 45(2): 641-655.
- BVL (2015). Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2013 - Zoonosen-Monitoring. BVL-Report 9.4: 1-70.
- Byrd, J. A., D. E. Corrier, M. E. Hume, R. H. Bailey, L. H. Stanker and B. M. Hargis (1998). Effect of feed withdrawal on *Campylobacter* in the crops of market-age broiler chickens. Avian Diseases 42(4): 802-806.
- Byrd, J. A., B. M. Hargis, D. J. Caldwell, R. H. Bailey, K. L. Herron, J. L. McReynolds, R. L. Brewer, R. C. Anderson, K. M. Bischoff, T. R. Callaway and L. F. Kubena (2001). Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. Poultry Science 80(3): 278-283.
- Callicott, K. A., V. Fridriksdottir, J. Reiersen, R. Lowman, J. R. Bisailon, E. Gunnarsson, E. Berndtson, K. L. Hiatt, D. S. Needleman and N. J. Stern (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. Applied and Environmental Microbiology 72(9): 5794-5798.
- Camarda, A., D. G. Newell, R. Nasti and G. Di Modugno (2000). Genotyping *Campylobacter jejuni* strains isolated from the gut and oviduct of laying hens. Avian Diseases 44(4): 907-912.

- Carramiñana, J. J., J. Yanguela, D. Blanco, C. Rota, A. I. Agustin, A. Arino and A. Herrera (1997). *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. Journal of Food Protection 60(11): 1312-1317.
- Cason, J. A., N. A. Cox and J. S. Bailey (1994). Transmission of *Salmonella typhimurium* During Hatching of Broiler Chicks. Avian Diseases 38(3): 583-588.
- Cason, J. A., J. S. Bailey, N. J. Stern, A. D. Whittemore and N. A. Cox (1997). Relationship between aerobic bacteria, salmonellae, and *Campylobacter* on broiler carcasses. Poultry Science 76(7): 1037-1041.
- Cason, J. A., R. J. Buhr, J. A. Dickens, M. T. Musgrove and N. J. Stern (1999). Carcass microbiological quality following intermittent scalding and defeathering. Journal of Applied Poultry Research 8(3): 368-373.
- Cason, J. A., A. Hinton and R. J. Buhr (2004). Impact of feathers and feather follicles on broiler carcass bacteria. Poultry Science 83(8): 1452-1455.
- Cason, J. A. and A. Hinton, Jr. (2006). Coliforms, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* in a counterflow poultry scalding tank with a dip tank. International Journal of Poultry Science 5(9): 846-849.
- CDC (2013). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>  
Abgerufen am: 06.06.2013.
- Chaban, B., K. M. Musil, C. G. Himsforth and J. E. Hill (2009). Development of cpn60-Based Real-Time Quantitative PCR Assays for the Detection of 14 *Campylobacter* Species and Application to Screening of Canine Fecal Samples. Applied and Environmental Microbiology 75(10): 3055-3061.
- Cibin, V., M. Mancin, K. Pedersen, F. Barrucci, S. Belluco, A. Roccato, F. Cocola, S. Ferrarini, A. Sandri, D. Lau Baggesen and A. Ricci (2014). Usefulness of *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* as Process Hygiene Criteria in poultry: experimental study. EFSA supporting publication 2014:EN-635: 1-121.
- Clouser, C. S., S. Doores, M. G. Mast and S. J. Knabel (1995). The role of defeathering in the contamination of turkey skin by *Salmonella* species and *Listeria monocytogenes*. Poultry Science 74(4): 723-731.
- Cony, A. V., L. R. dos Santos, E. Martello and V. P. do Nascimento (2015). Progeny Benefits by the Use of *Salmonella* Enteritidis Oily Vaccine in Broiler Breeders. Acta Scientiae Veterinariae 43: 6.
- Cools, I., M. Uyttendaele, J. Cerpentier, E. D'Haese, H. J. Nelis and J. Debevere (2005). Persistence of *Campylobacter jejuni* on surfaces in a processing environment and on cutting boards. Letters in Applied Microbiology 40(6): 418-423.
- Corrier, D. E., J. A. Byrd, B. M. Hargis, M. E. Hume, R. H. Bailey and L. H. Stanker (1999). Presence of *Salmonella* in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. Poultry Science 78(1): 45-49.
- Corry, J. E. L., D. E. Post, P. Colin and M. J. Laisney (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. International Journal of Food Microbiology 26(1): 43-76.

- Corry, J. E. L. and H. I. Atabay (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Journal of Applied Microbiology 90: 96S-114S.
- Corry, J. E. L., V. M. Allen, W. R. Hudson, M. F. Breslin and R. H. Davies (2002). Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. Journal of Applied Microbiology 92(3): 424-432.
- Corry, J. E. L., S. J. James, G. Purnell, C. S. Barbedo-Pinto, Y. Chochois, M. Howell and C. James (2007). Surface pasteurisation of chicken carcasses using hot water. Journal of Food Engineering 79(3): 913-919.
- Cox, N. A., R. J. Buhr, D. P. Smith, J. A. Cason, L. L. Rigsby, D. V. Bourassa, P. J. Fedorka-Cray and D. E. Cosby (2014). Sampling Naturally Contaminated Broiler Carcasses for *Salmonella* by Three Different Methods. Journal of Food Protection 77(3): 493-495.
- Craig, E. W., D. L. Fletcher and P. A. Papinaho (1999). The effects of antemortem electrical stunning and postmortem electrical stimulation on biochemical and textural properties of broiler breast meat. Poultry Science 78(3): 490-494.
- D'Aoust, J. Y. (1991). Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology 13(3): 207-216.
- De Medici, D., L. Croci, E. Delibato, S. Di Pasquale, E. Filetici and L. Toti (2003). Evaluation of DNA Extraction Methods for Use in Combination with SYBR Green I Real-Time PCR To Detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in Poultry. Applied and Environmental Microbiology 69(6): 3456-3461.
- De Smedt, J. M., R. F. Bolderdijk, H. Rappold and D. Lautenschlaeger (1986). Rapid *Salmonella* Detection in Foods by Motility Enrichment on a Modified Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Medium. Journal of Food Protection 49(7): 510-514.
- Devane, M. L., C. Nicol, A. Ball, J. D. Klena, P. Scholes, J. A. Hudson, M. G. Baker, B. J. Gilpin, N. Garrett and M. G. Savill (2005). The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. Journal of Applied Microbiology 98(4): 980-990.
- DGHM (2011). Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. [www.dghm.org/m\\_275](http://www.dghm.org/m_275) Abgerufen am: 12.07.2015.
- DLG-Ausschuss für Geflügelproduktion; Berk, J. (2014). DLG-Merkblatt 406: Haltung von Masthühnern: Haltungsansprüche – Fütterung – Tiergesundheit. [http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/merkblaetter/dlg-merkblatt\\_406.pdf](http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/merkblaetter/dlg-merkblatt_406.pdf) Abgerufen am: 10.07.2015
- Domingues, A. R., S. M. Pires, T. Halasa and T. Hald (2012). Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. Epidemiology and Infection 140(6): 970-981.
- Duffy, L. L., P. J. Blackall, R. N. Cobbold and N. Fegan (2014). Quantitative effects of in-line operations on *Campylobacter* and *Escherichia coli* through two Australian broiler processing plants. International Journal of Food Microbiology 188: 128-134.
- Eberle, K. N. and A. S. Kiess (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. Poultry Science 91(1): 255-264.

Edel, W. and E. H. Kampelmacher (1973). Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" salmonellae in nine European laboratories. Bulletin of the World Health Organization 48(2): 167-174.

EFSA (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal 9(4): 1-141.

EFSA Panel on Biological Hazards (2004). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the requests from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. The EFSA Journal(114): 1-74.

EFSA und ECDC (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 13(1): 1-162.

Ellerbroek, L. (1997). Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. Food Microbiology 14(6): 527-531.

Ellerbroek, L. I., J. A. Lienau and G. Klein (2010). *Campylobacter* spp. in broiler flocks at farm level and the potential for cross-contamination during slaughter. Zoonoses Public Health 57(7-8): e81-88.

Elvers, K. T., V. K. Morris, D. G. Newell and V. M. Allen (2011). Molecular Tracking, through Processing, of *Campylobacter* Strains Colonizing Broiler Flocks. Applied and Environmental Microbiology 77(16): 5722-5729.

Evans, S. J. and A. R. Sayers (2000). A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Preventive Veterinary Medicine 46(3): 209-223.

Evers, E. G. (2004). Predicted quantitative effect of logistic slaughter on microbial prevalence. Preventive Veterinary Medicine 65(1-2): 31-46.

FAO (2015). Food Outlook. Biannual report on global food markets. May 2015. ISSN 0251-1959.

Fletcher, D. L. (1999). Slaughter technology. Poultry Science 78(2): 277-281.

Fluckey, W. M., M. X. Sanchez, S. R. McKee, D. Smith, E. Pendleton and M. M. Brashears (2003). Establishment of a microbiological profile for an air-chilling poultry operation in the United States. Journal of Food Protection 66(2): 272-279.

Foster, J. W. (1991). *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. Journal of Bacteriology 173(21): 6896-6902.

Franz, E., H. J. v. d. Fels-Klerx, J. Thissen and E. D. v. Asselt (2012). Farm and slaughterhouse characteristics affecting the occurrence of *Salmonella* and *Campylobacter* in the broiler supply chain. Poultry Science 91(9): 2376-2381.

Fravalo, P., Y. Hascoet, M. Le Fellic, S. Queguiner, J. Petton and G. Salvat (2003). Convenient method for rapid and quantitative assessment of *Salmonella enterica* contamination: The mini-MSRV MPN technique. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 11(2): 81-88.

Fries, R. and C. Graw (1999). Water and air in two poultry processing plant's chilling facilities - a bacteriological survey. British Poultry Science 40(1): 52-58.

- Fries, R., V. Bergmann and K. Fehlhaber (2001). Praxis der Geflügelfleischuntersuchung. Hannover: Schlütersche Verlag. 240 S.
- Fries, R. (2002). Reducing *Salmonella* transfer during industrial poultry meat production. Worlds Poultry Science Journal 58(4): 527-540.
- Gallien, P., H. Richter, H. Klie, M. Timm, H. Karch, K. W. Perlberg, H. Steinruck, S. Riemer, M. Djuren and D. Protz (1997). Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient. Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift 110(9): 342-346.
- Gantois, I., R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Gast, T. J. Humphrey and F. Van Immerseel (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. Fems Microbiology Reviews 33(4): 718-738.
- Georgsson, F., A. E. Porkelsson, M. Geirsdottir, J. Reiersen and N. J. Stern (2006). The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. Food Microbiology 23(7): 677-683.
- Geornaras, I., A. Dejesus, E. Vanzyl and A. Vonholy (1995). Microbiological survey of a South African poultry processing plant. Journal of Basic Microbiology 35(2): 73-82.
- Geornaras, I., A. E. deJesus, E. vanZyl and A. vonHoly (1997). Bacterial populations of different sample types from carcasses in the dirty area of a South African poultry abattoir. Journal of Food Protection 60(5): 551-554.
- Geornaras, I. and A. von Holy (2000). Bacterial counts associated with poultry processing at different sampling times. Journal of Basic Microbiology 40(5-6): 343-349.
- Gill, C. O. and C. Landers (2003). Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. Meat Science 65(3): 1005-1011.
- Gill, C. O., M. Badoni, L. F. Moza, S. Barbut and M. W. Griffiths (2005). Microbiological sampling of poultry carcass portions by excision, rinsing, or swabbing. Journal of Food Protection 68(12): 2718-2720.
- Gill, C. O., L. F. Moza, A. Badoni and S. Barbut (2006). The effects on the microbiological condition of product of carcass dressing, cooling, and portioning processes at a poultry packing plant. International Journal of Food Microbiology 110(2): 187-193.
- Gilpin, B. J., P. Scholes, B. Robson and M. G. Savill (2008). The transmission of thermotolerant *Campylobacter* spp. To people living or working on dairy farms in New Zealand. Zoonoses and Public Health 55(7): 352-360.
- Giombelli, A., R. Cavani and M. B. A. Gloria (2013). Evaluation of Three Sampling Methods for the Microbiological Analysis of Broiler Carcasses after Immersion Chilling. Journal of Food Protection 76(8): 1330-1335.
- Göksoy, E. O., L. J. McKinstry, L. J. Wilkins, I. Parkman, A. Phillips, R. I. Richardson and M. H. Anil (1999). Broiler stunning and meat quality. Poultry Science 78(12): 1796-1800.
- Göksoy, E. O., S. Kirkan and F. Kok (2004). Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. Poultry Science 83(8): 1427-1432.

- Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemuhl, P. A. D. Grimont and F. X. Weill (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Research in Microbiology 161(1): 26-29.
- Gun-Munro, J., R. P. Rennie, J. H. Thornley, H. L. Richardson, D. Hodge and J. Lynch (1987). Laboratory and Clinical Evaluation of Isolation Media for *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology 25(12): 2274-2277.
- Habib, I., M. Uyttendaele and L. De Zutter (2011). Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. Food Microbiology 28(6): 1117-1123.
- Hald, B., E. Rattenborg and M. Madsen (2001). Role of batch depletion of broiler houses on the occurrence of *Campylobacter* spp. in chicken flocks. Letters in Applied Microbiology 32(4): 253-256.
- Hald, B., H. M. Sommer and H. Skovgard (2007). Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp, introduction in broiler houses. Emerging Infectious Diseases 13(12): 1951-1953.
- Hald, B., H. Skovgard, K. Pedersen and H. Bunkenborg (2008). Influxed insects as vectors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Danish broiler houses. Poultry Science 87(7): 1428-1434.
- Hargis, B. M., D. J. Caldwell, R. L. Brewer, D. E. Corrier and J. R. DeLoach (1995). Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. Poultry Science 74(9): 1548-1552.
- Hauser, E., E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, R. Prager, A. Schroeter, W. Rabsch, A. Fruth, A. Toboldt and B. Malorny (2012). Clonal Dissemination of *Salmonella enterica* Serovar Infantis in Germany. Foodborne Pathogens and Disease 9(4): 352-360.
- Havelaar, A. H., M. J. J. Manges, A. A. de Koeijer, M. J. Bogaardt, E. G. Evers, W. E. Jacobs-Reitsma, W. van Pelt, J. A. Wagenaar, G. A. de Wit, H. van der Zee and M. J. Nauta (2007). Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. Risk Analysis 27(4): 831-844.
- Hébert, G. A., D. G. Hollis, R. E. Weaver, M. A. Lambert, M. J. Blaser and C. W. Moss (1982). 30 years of campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology 15(6): 1065-1073.
- Henzler, D. J. and H. M. Opitz (1992). The Role of Mice in the Epizootiology of *Salmonella enteritidis* Infection on Chicken Layer Farms Avian Diseases 36(3): 625-631.
- Herman, L., M. Heyndrickx, K. Grijspeerdt, D. Vandekerchove, I. Rollier and L. De Zutter (2003). Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. Epidemiology and Infection 131(3): 1169-1180.
- Hermans, D., K. Van Deun, W. Messens, A. Martel, F. Van Immerseel, F. Haesebrouck, G. Rasschaert, M. Heyndrickx and F. Pasmans (2011). *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: Urgent need for intensified fundamental research. Veterinary Microbiology 152(3-4): 219-228.
- Heuer, O. E., K. Pedersen, J. S. Andersen and M. Madsen (2001). Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. Letters in Applied Microbiology 33(4): 269-274.

Heyndrickx, M., D. Vandekerchove, L. Herman, I. Roller, K. Grijspeerdt and L. De Zutter (2002). Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. Epidemiology and Infection 129(2): 253-265.

Hinton, A., R. J. Buhr and K. D. Ingram (2000). Physical, chemical, and microbiological changes in the crop of broiler chickens subjected to incremental feed withdrawal. Poultry Science 79(2): 212-218.

Hue, O., S. Le Bouquin, M. J. Laisney, V. Allain, F. Lalande, I. Petetin, S. Rouxel, S. Quesne, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, J. Santolini, G. Salvat, S. Bougeard and M. Chemaly (2010). Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. Food Microbiology 27(8): 992-999.

Hue, O., S. Le Bouquin, F. Lalande, V. Allain, S. Rouxel, I. Petetin, S. Quesne, M. J. Laisney, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, G. Salvat, S. Bougeard and M. Chemaly (2011a). Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. Food Control 22(8): 1158-1164.

Hue, O., V. Allain, M. J. Laisney, S. Le Bouquin, F. Lalande, I. Petetin, S. Rouxel, S. Quesne, P. Y. Gloaguen, M. Picherot, J. Santolini, S. Bougeard, G. Salvat and M. Chemaly (2011b). *Campylobacter* contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with *Salmonella* contamination. Food Microbiology 28(5): 862-868.

Huezo, R., J. K. Northcutt, D. P. Smith, D. L. Fletcher and K. D. Ingram (2007). Effect of dry air or immersion chilling on recovery of bacteria from broiler carcasses. Journal of Food Protection 70(8): 1829-1834.

ISO (2007). ISO 6579:2007-10. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

ISO (2010). ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E) . Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 3: Semi-quantitative method.

ISO (2012). ISO/TS 6579-2:2012 (E). Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -- Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique.

ISO (2015). ISO 10272-1:2015-04. Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method (ISO/DIS 10272-1:2015).

Issenhuth-Jeanjean, S., P. Roggentin, M. Mikoleit, M. Guibourdenche, E. de Pinna, S. Nair, P. I. Fields and F. X. Weill (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol 165(7): 526-530.

IUL Instruments GmbH (2001). Benutzerhandbuch Spiralplattensystem Eddy Jet v. 1.22. Königswinter.

Izat, A. L., F. A. Gardner, J. H. Denton and F. A. Golan (1988). Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. Poultry Science 67(11): 1568-1572.

Jacobs-Reitsma, W. F., A. W. Vandegiessen, N. M. Bolder and R. W. A. Mulder (1995). Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. Epidemiology and Infection 114(3): 413-421.

- James, C., C. Vincent, T. Lima and S. J. James (2006). The primary chilling of poultry carcasses - a review. International Journal of Refrigeration 29(6): 847-862.
- James, C., S. J. James, N. Hannay, G. Purnell, C. Barbedo-Pinto, H. Yaman, M. Araujo, M. L. Gonzalez, J. Calvo, M. Howell and J. E. L. Corry (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. International Journal of Food Microbiology 114(2): 195-203.
- Jiménez, S. M., M. S. Salsi, M. C. Tiburzi and M. E. Pirovani (2002). A comparison between broiler chicken carcasses with and without visible faecal contamination during the slaughtering process on hazard identification of *Salmonella* spp. Journal of Applied Microbiology 93(4): 593-598.
- Jiménez, S. M., M. C. Tiburzi, M. S. Salsi, M. E. Pirovani and M. A. Moguevsky (2003). The role of visible faecal material as a vehicle for generic *Escherichia coli*, coliform, and other enterobacteria contaminating poultry carcasses during slaughtering. Journal of Applied Microbiology 95(3): 451-456.
- Johannessen, G. S., G. Johnsen, M. Okland, K. S. Cudjoe and M. Hofshagen (2007). Enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. from poultry carcasses at the end of the slaughter-line. Letters in Applied Microbiology 44(1): 92-97.
- Jones, F. T., R. C. Axtell, D. V. Rives, S. E. Scheideler, F. R. Tarver, R. L. Walker and M. J. Wineland (1991). A Survey of *Salmonella* Contamination in Modern Broiler Production. Journal of Food Protection 54(7): 502-507.
- Jørgensen, F., R. Bailey, S. Williams, P. Henderson, D. R. A. Wareing, F. J. Bolton, J. A. Frost, L. Ward and T. J. Humphrey (2002). Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology 76(1-2): 151-164.
- Kapperud, G. and S. Aasen (1992). Descriptive epidemiology of infections due to thermotolerant *Campylobacter* spp. in Norway, 1979-1988. Apmis 100(10): 883-890.
- Karolyi, L. G., H. Medic, S. Vidacek, T. Petrak and K. Botka-Petrak (2003). Bacterial population in counter flow and parallel flow water chilling of poultry meat. European Food Research and Technology 217(5): 412-415.
- Keener, K. M., M. P. Bashor, P. A. Curtis, B. W. Sheldon and S. Kathariou (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3(2): 105-116.
- Kim, A., Y. J. Lee, M. S. Kang, S. I. Kwag and J. K. Cho (2007). Dissemination and tracking of *Salmonella* spp. in integrated broiler operation. Journal of Veterinary Science 8(2): 155-161.
- Kim, J. W., M. F. Slavik, C. L. Griffis and J. T. Walker (1993). Attachment of *Salmonella typhimurium* to Skins of Chicken Scalded at Various Temperatures. Journal of Food Protection 56(8): 661-&.
- Kim, J. Y., J. A. Young, N. W. Gunther and J.-L. Lee (2015). Inhibition of *Salmonella* by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Derived from U.S. Kimchi and Broiler Chicken. Journal of Food Safety 35(1): 1-12.

Kittler, S., S. Fischer, A. Abdulmawjood, G. Glunder and G. Klein (2013). Effect of Bacteriophage Application on *Campylobacter jejuni* Loads in Commercial Broiler Flocks. Applied and Environmental Microbiology 79(23): 7525-7533.

Klein, G., L. Beckmann, H. M. Vollmer and E. Bartelt (2007). Predominant strains of thermophilic *Campylobacter* spp. in a German poultry slaughterhouse. International Journal of Food Microbiology 117(3): 324-328.

Kotula, K. L. and Y. Pandya (1995). Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. Journal of Food Protection 58(12): 1326-1329.

Kudirkienė, E., J. Buneviciene, L. Brondsted, H. Ingmer, J. E. Olsen and M. Malakauskas (2011). Evidence of broiler meat contamination with post-disinfection strains of *Campylobacter jejuni* from slaughterhouse. International Journal of Food Microbiology 145: S116-S120.

Kudirkienė, E., M. T. Cohn, R. A. Stabler, P. C. R. Strong, L. Serniene, B. W. Wren, E. M. Nielsen, M. Malakauskas and L. Brondsted (2012). Phenotypic and Genotypic Characterizations of *Campylobacter jejuni* Isolated from the Broiler Meat Production Process. Current Microbiology 65(4): 398-406.

Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, W. C. Hazeleger and R. R. Beumer (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. International Journal of Food Microbiology 85(3): 227-236.

Le Minor, L. and M. Y. Popoff (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion International Journal of Systematic Bacteriology 37(4): 465-468.

Lehner, Y. (2010). Prozessoptimierungen in der Broilerschlachtung zur quantitativen Reduktion von thermophilen *Campylobacter* spp. auf frischem Geflügelfleisch und -produkten. Hannover. Tierärztliche Hochschule Hannover. Diss. 214 S.

Lehner, Y., F. Reich and G. Klein (2014). Influence of Process Parameter on *Campylobacter* spp. Counts on Poultry Meat in a Slaughterhouse Environment. Current Microbiology 69(3): 240-244.

Li, Y., H. Yang and B. L. Swem (2002). Effect of high-temperature inside-outside spray on survival of *Campylobacter jejuni* attached to prechill chicken carcasses. Poultry Science 81(9): 1371-1377.

Liljebjelke, K. A., C. L. Hofacre, T. R. Liu, D. G. White, S. Ayers, S. Young and J. J. Maurer (2005). Vertical and horizontal transmission of *Salmonella* within integrated broiler production system. Foodborne Pathogens and Disease 2(1): 90-102.

Lillard, H. S., A. A. Klose, R. I. Hegge and V. Chew (1973). Microbiological comparison of steam-scalded (at sub-atmospheric pressure) and immersion-scalded broilers. Journal of Food Science 38(5): 903-904.

Lillard, H. S. (1990). The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. Journal of Food Protection 53(3): 202-204.

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>  
Abgerufen am: 15.09.2015

- Löhren, U. (2012). Overview on current practices of poultry slaughtering and poultry meat inspection. Supporting Publications 2012:EN-298: 1-58.
- Loretz, M., R. Stephan and C. Zweifel (2010). Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. Food Control 21(6): 791-804.
- Mainali, C., G. Gensler, M. McFall, R. King, R. Irwin and A. Senthilselvan (2009). Evaluation of Associations between Feed Withdrawal and Other Management Factors with *Salmonella* Contamination of Broiler Chickens at Slaughter in Alberta. Journal of Food Protection 72(10): 2202-2207.
- Malorny, B., C. Lofstrom, M. Wagner, N. Kramer and J. Hoorfar (2008). Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. Applied and Environmental Microbiology 74(5): 1299-1304.
- Marin, C., S. Balasch, S. Vega and M. Lainez (2011). Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. Preventive Veterinary Medicine 98(1): 39-45.
- Matias, B. G., P. S. D. Pinto, M. V. C. Cossi and L. A. Nero (2010). *Salmonella* spp. and Hygiene Indicator Microorganisms in Chicken Carcasses Obtained at Different Processing Stages in Two Slaughterhouses. Foodborne Pathogens and Disease 7(3): 313-318.
- Mattick, K. L., F. Jorgensen, J. D. Legan, M. B. Cole, J. Porter, H. M. Lappin-Scott and T. J. Humphrey (2000). Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. Applied and Environmental Microbiology 66(4): 1274-1279.
- McDowell, S. W. J., F. D. MenzieS, S. H. McBride, A. Oza, J. P. McKenna, A. W. Gordon and S. D. Neillab (2008). *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: Epidemiology and risk factors. Preventive Veterinary Medicine 84(3-4): 261-276.
- McKeegan, D. E. F., S. M. Abeyesinghe, M. A. McLeman, J. C. Lowe, T. G. M. Demmers, R. P. White, R. W. Kranen, H. Van Bommel, J. A. C. Lankhaar and C. M. Wathes (2007). Controlled atmosphere stunning of broiler chickens. II. Effects on behaviour, physiology and meat quality in a commercial processing plant. British Poultry Science 48(4): 430-442.
- Mead, G., A. M. Lammerding, N. Cox, M. P. Doyle, F. Humbert, A. Kulikovskiy, A. Panin, V. P. do Nascimento, M. Wierup and C. Salmonella Raw Poultry Writing (2010). Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: Global Perspective. Journal of Food Protection 73(8): 1566-1590.
- Mead, G. C., M. J. Scott, T. J. Humphrey and K. McAlpine (1996). Observations on the control of *Campylobacter jejuni* infection of poultry by 'competitive exclusion'. Avian Pathology 25(1): 69-79.
- Mead, G. C., V. M. Allen, C. H. Burton and J. E. L. Corry (2000). Microbial cross-contamination during air chilling of poultry. British Poultry Science 41(2): 158-162.
- Meinersmann, R. J., L. O. Helsel, P. I. Fields and K. L. Hiatt (1997). Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology 35(11): 2810-2814.
- Melero, B., P. Juntunen, M. L. Hanninen, I. Jaime and J. Rovira (2012). Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. Food Microbiology 32(1): 124-128.

Merck KGaA (2003). Gebrauchsanleitung Anaerocult® C, 1162750001 in Vitro Diagnostikum. Version 2003-04-30. Darmstadt.

Miljković-Selimović, B., T. Babic, B. Kocić, A. Matkic and L. Ristic (2014). Identification of *Campylobacter* Species Isolates with Phenotypic Methods and Polymerase Chain Reaction. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo 142(11-12): 708-712.

Moriarty, E. M., M. Downing, J. Bellamy and B. J. Gilpin (2015). Concentrations of faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci and *Campylobacter* spp. in equine faeces. New Zealand Veterinary Journal 63(2): 104-109.

Mulder, R., L. W. J. Dorresteyn and J. Vanderbroek (1978). Cross-contamination during the scalding and plucking of broilers. British Poultry Science 19(1): 61-70.

Mulder, R. (1995). Impact of transport and related stresses on the incidence and extent of human pathogens in pigmeat and poultry. Journal of Food Safety 15(3): 239-246.

Musgrove, M. T., J. A. Cason, D. L. Fletcher, N. J. Stern, N. A. Cox and J. S. Bailey (1997). Effect of cloacal plugging on microbial recovery from partially processed broilers. Poultry Science 76(3): 530-533.

Nauta, M., I. van der Fels-Klerx and A. Havelaar (2005). A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. Risk Analysis 25(1): 85-98.

Nauta, M., A. Hill, H. Rosenquist, S. Brynestad, A. Fetsch, P. van der Logt, A. Fazil, B. Christensen, E. Katsma, B. Borck and A. Havelaar (2009a). A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. International Journal of Food Microbiology 129(2): 107-123.

Nauta, M. J., F. J. v. d. Wal, F. F. Putirulan, J. Post, J. v. d. Kassteele and N. M. Bolder (2009b). Evaluation of the "testing and scheduling" strategy for control of *Campylobacter* in broiler meat in The Netherlands. International Journal of Food Microbiology 134(3): 216-222.

Nde, C. W., J. M. McEvoy, J. S. Sherwood and C. M. Logue (2007). Cross contamination of turkey carcasses by *Salmonella* species during defeathering. Poultry Science 86(1): 162-167.

Newell, D. G., J. E. Shreeve, M. Toszeghy, G. Domingue, S. Bull, T. Humphrey and G. Mead (2001). Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. Applied and Environmental Microbiology 67(6): 2636-2640.

Newell, D. G. and C. Fearnley (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology 69(8): 4343-4351.

Northcutt, J. K., M. E. Berrang, J. A. Dickens, D. L. Fletcher and N. A. Cox (2003a). Effect of broiler age, feed withdrawal, and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. Poultry Science 82(1): 169-173.

Northcutt, J. K., M. E. Berrang, D. P. Smith and D. R. Jones (2003b). Effect of commercial bird washers on broiler carcass microbiological characteristics. Journal of Applied Poultry Research 12(4): 435-438.

Northcutt, J. K., D. P. Smith, M. T. Musgrove, K. D. Ingram and A. Hinton (2005). Microbiological impact of spray washing broiler carcasses using different chlorine concentrations and water temperatures. Poultry Science 84(10): 1648-1652.

- Nurmi, E. and M. Rantala (1973). New Aspects of *Salmonella* Infection in Broiler Production. Nature 241(5386): 210-211.
- Nylen, G., F. Dunstan, S. R. Palmer, Y. Andersson, F. Bager, J. Cowden, G. Feierl, Y. Galloway, G. Kapperud, F. Megraud, K. Molbak, L. R. Petersen and P. Ruutu (2002). The seasonal distribution of *Campylobacter* infection in nine European countries and New Zealand. Epidemiology and Infection 128(3): 383-390.
- Olsen, J. E., D. J. Brown, M. Madsen and M. Bisgaard (2003). Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. Journal of Applied Microbiology 94(5): 826-835.
- Oosterom, J., G. J. A. Dewilde, E. Deboer, L. H. Deblaauw and H. Karman (1983). Survival of *Campylobacter jejuni* during Poultry Processing and Pig Slaughtering. Journal of Food Protection 46(8): 702-&.
- Palmu, L. and I. Camelin (1997). The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of *Salmonella* contamination on the farm and at the processing plant. Poultry Science 76(11): 1501-1505.
- Perko-Mäkelä, P., T. Alter, P. Isohanni, S. Zimmermann and U. Lyhs (2011). Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey Farms and Different Stages at Slaughter Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and *flaA*-Short Variable Region Sequencing. Zoonoses and Public Health 58(6): 388-398.
- Peterson, M. C. (1994). Rheumatic Manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* Infections in Adults. Scandinavian Journal of Rheumatology 23(4): 167-170.
- Peyrat, M. B., C. Soumet, P. Maris and P. Sanders (2008). Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. International Journal of Food Microbiology 124(2): 188-194.
- Potturi-Venkata, L. P., S. Backert, S. L. Vieira and O. A. Oyarzabal (2007). Evaluation of logistic processing to reduce cross-contamination of commercial broiler carcasses with *Campylobacter* spp. Journal of Food Protection 70(11): 2549-2554.
- Public databases for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST). <http://pubmlst.org/campylobacter/> Abgerufen am: 06.06.2015
- Purnell, G., K. Mattick and T. Humphrey (2004). The use of 'hot wash' treatments to reduce the number of pathogenic and spoilage bacteria on raw retail poultry. Journal of Food Engineering 62(1): 29-36.
- Purnell, G., C. James, S. J. James, M. Howell and J. E. L. Corry (2014). Comparison of Acidified Sodium Chlorite, Chlorine Dioxide, Peroxyacetic Acid and Tri-Sodium Phosphate Spray Washes for Decontamination of Chicken Carcasses. Food and Bioprocess Technology 7(7): 2093-2101.
- Que, F. X., S. Y. Wu and R. Huang (2013). *Salmonella* Pathogenicity Island 1(SPI-1) at Work. Current Microbiology 66(6): 582-587.
- Rahn, K., S. A. Degrandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss and C. L. Gyles (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Molecular and Cellular Probes 6(4): 271-279.

Raj, A. B. M., N. G. Gregory and L. J. Wilkins (1992). Survival rate and carcass downgrading after the stunning of broilers with carbon dioxide-argon mixtures. Veterinary Record 130(15): 325-328.

Ramabu, S. S., N. S. Boxall, P. Madie and S. G. Fenwick (2004). Some potential sources for transmission of *Campylobacter jejuni* to broiler chickens. Letters in Applied Microbiology 39(3): 252-256.

Rasschaert, G., K. Houf and L. De Zutter (2007a). Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. Journal of Applied Microbiology 103(2): 333-341.

Rasschaert, G., K. Houf, J. Van Hende and L. De Zutter (2007b). Investigation of the concurrent colonization with *Campylobacter* and *Salmonella* in poultry flocks and assessment of the sampling site for status determination at slaughter. Veterinary Microbiology 123(1-3): 104-109.

Rasschaert, G., K. Houf, C. Godard, C. Wildemaue, M. Pastuszczak-Frak and L. De Zutter (2008). Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. Journal of Food Protection 71(1): 146-152.

Reich, F., V. Atanassova, E. Haunhorst and G. Klein (2008). The effects of *Campylobacter* numbers in caeca on the contamination of broiler carcasses with *Campylobacter*. International Journal of Food Microbiology 127(1-2): 116-120.

Reiter, M. G. R., M. L. Fiorese, G. Morett, M. C. Lopez and R. Jordano (2007). Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. Journal of Food Protection 70(7): 1723-1725.

Rivera-Pérez, W., E. Barquero-Calvo and R. Zamora-Sanabria (2014). *Salmonella* contamination risk points in broiler carcasses during slaughter line processing. Journal of Food Protection 77(12): 2031-2034.

RKI (2015). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Berlin: Robert Koch Institut. 233 S.

Robinson, D. A. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. British Medical Journal 282(6276): 1584-1584.

Rollins, D. M. and R. R. Colwell (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology 52(3): 531-538.

Rosenquist, H., N. L. Nielsen, H. M. Sommer, B. Norrung and B. B. Christensen (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. International Journal of Food Microbiology 83(1): 87-103.

Rosenquist, H., H. M. Sommer, N. L. Nielsen and B. B. Christensen (2006). The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. International Journal of Food Microbiology 108(2): 226-232.

Russell, S. M. and J. M. Walker (1997). The effect of evisceration on visible contamination and the microbiological profile of fresh broiler chicken carcasses using the Nu-Tech evisceration system or the conventional streamlined inspection system. Poultry Science 76(5): 780-784.

- Russell, S. M. (2003). The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. Poultry Science 82(8): 1326-1331.
- Russell, S. M. (2012). Controlling Salmonella in poultry production and processing. Boca Raton: CRC Press. 310 S.
- Sampers, I., L. Jacxsens, P. A. Luning, W. J. Marcelis, A. Dumoulin and M. Uyttendaele (2010). Performance of Food Safety Management Systems in Poultry Meat Preparation Processing Plants in Relation to *Campylobacter* spp. Contamination. Journal of Food Protection 73(8): 1447-1457.
- Sams, A. (1999). Commercial implementation of postmortem electrical stimulation. Poultry Science 78(2): 290-294.
- Sandberg, M., M. Hofshagen, O. Ostensvik, E. Skjerve and G. Innocent (2005). Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time. Journal of Food Protection 68(8): 1600-1605.
- Santos, R. L. (2014). Pathobiology of *Salmonella*, intestinal microbiota, and the host innate immune response. Frontiers in Immunology 5: 1-7.
- Sasaki, Y., N. Maruyama, B. Zou, M. Haruna, M. Kusukawa, M. Murakami, T. Asai, Y. Tsujiyama and Y. Yamada (2012). *Campylobacter* Cross-Contamination of Chicken Products at an Abattoir. Zoonoses and Public Health 60(2): 134-140.
- Scherer, K. (2007). Zur quantitativen Bestimmung von *Campylobacter* spp. auf der Oberfläche und im Muskel von Hähnchenfleisch aus dem Handel; Vergleich von verschiedenen Isolierungstechniken und Zählverfahren. Berlin. Freie Universität Berlin. Diss. 131 S.
- Schmid, G. P., R. E. Schaefer, B. D. Plikaytis, J. R. Schaefer, J. H. Bryner, L. A. Wintermeyer and A. F. Kaufmann (1987). A one-year study of endemic campylobacteriosis in a midwestern city: association with consumption of raw milk. Journal of Infectious Diseases 156(1): 218-222.
- Sebald, M. and M. Véron (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. Annales de l'Institut Pasteur 105(5): 897-910.
- Seliwiorstow, T., J. Bare, I. Van Damme, M. Uyttendaele and L. De Zutter (2015). *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. International Journal of Food Microbiology 194: 25-31.
- Si, W., S. Y. Yu, L. P. Chen, X. M. Wang, W. J. Zhang, S. G. Liu and G. X. Li (2014). Passive protection against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection from maternally derived antibodies of hens vaccinated with a ghost vaccine. Research in Veterinary Science 97(2): 191-193.
- Skirrow, M. B. (1991). Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. International Journal of Food Microbiology 12(1): 9-16.
- Skov, M. N., A. G. Spencer, B. Hald, L. Petersen, B. Nauerby, B. Carstensen and M. Madsen (2004). The role of litter beetles as potential reservoir for *Salmonella enterica* and thermophilic *Campylobacter* spp. between broiler flocks. Avian Diseases 48(1): 9-18.

Slader, J., G. Domingue, F. Jorgensen, K. McAlpine, R. J. Owen, F. J. Bolton and T. J. Humphrey (2002). Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology 68(2): 713-719.

Slavik, M. F., J. W. Kim and J. T. Walker (1995). Reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* on Chicken Carcasses by Changing Scalding Temperature. Journal of Food Protection 58(6): 689-691.

Smith, D. P., J. K. Northcutt and M. T. Musgrove (2005a). Microbiology of contaminated or visibly clean broiler carcasses processed with an inside-outside bird washer. International Journal of Poultry Science 4(12): 955-958.

Smith, D. P., J. A. Cason and M. E. Berrang (2005b). Effect of fecal contamination and cross-contamination on numbers of coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on immersion-chilled broiler carcasses. Journal of Food Protection 68(7): 1340-1345.

Smulders, F. J. M., B. Gleisz, D. Sofka, A. Sacher, I. Omurtag, P. Paulsen and F. Hilbert (2011). Microbial ecology on poultry carcasses along the production line. Archiv Fur Lebensmittelhygiene 62(5): 170-174.

Sommer, H. M., O. E. Heuer, A. I. V. Sorensen and M. Madsen (2013). Analysis of factors important for the occurrence of *Campylobacter* in Danish broiler flocks. Preventive Veterinary Medicine 111(1-2): 100-111.

Statistisches Bundesamt (2015). Geflügelfleischerzeugung in Mill. Tonnen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/Grafik/Gefluegel.png;jsessionid=7FE675BE7B8B3391A6073199DC731F05.cae3? blob=p oster> Abgerufen am: 10.07.2015.

Statistisches Bundesamt (2015). Geflügel Fachserie 3 Reihe 4.2.3 - 2014. <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/LandForstwirtschaft/ViehbestandTierischeErzeugung/Gefluegel2030423147004.pdf? blob=publicationFile> Abgerufen am: 10.07.2015.

Steinbrueckner, B., G. Haerter, K. Pelz and M. Kist (1999). Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. Fems Microbiology Letters 179(2): 227-232.

Stephan, R., A. Lehner, C. Zweifel and H. Hächler (2014). Non-typhöse Salmonellen. Lebensmittelhygienische Bedeutung. Hamburg: Behr's Verlag. 80 S.

Stern, N. J., N. A. Cox, J. S. Bailey, M. E. Berrang and M. T. Musgrove (2001). Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. Poultry Science 80(2): 156-160.

Stern, N. J., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. D. Pokhilenko, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch and B. S. Seal (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50(9): 3111-3116.

Svobodova, I., G. Borilova, R. Hulankova and I. Steinhäuserova (2012). Microbiological quality of broiler carcasses during slaughter processing. Acta Veterinaria Brno 81(1): 37-42.

Thomas, C. J. and T. A. McMeekin (1980). Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. Applied and Environmental Microbiology 40(1): 133-144.

Toboldt, A., E. Tietze, R. Helmuth, A. Fruth, E. Junker and B. Malorny (2012). Human Infections Attributable to the D-Tartrate-Fermenting Variant of *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B in Germany Originate in Reptiles and, on Rare Occasions, Poultry. Applied and Environmental Microbiology 78(20): 7347-7357.

Tustin, J., K. Laberge, P. Michel, J. Reiersen, S. Dadadottir, H. Briem, H. Hardardottir, K. Kristinsson, E. Gunnarsson, V. Fridriksdottir and F. Georgsson (2011). A National Epidemic of Campylobacteriosis in Iceland, Lessons Learned. Zoonoses and Public Health 58(6): 440-447.

Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, D. J. Platt and J. E. Olsen (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiology and Infection 125(2): 229-255.

Van Immerseel, F., L. De Zutter, K. Houf, F. Pasmans, F. Haesebrouck and R. Ducatelle (2009). Strategies to control *Salmonella* in the broiler production chain. Worlds Poultry Science Journal 65(3): 367-391.

Volkova, V. V., R. H. Bailey, M. L. Rybolt, K. Dazo-Galarneau, S. A. Hubbard, D. Magee, J. A. Byrd and R. W. Wills (2010). Inter-relationships of *Salmonella* Status of Flock and Grow-Out Environment at Sequential Segments in Broiler Production and Processing. Zoonoses and Public Health 57(7-8): 463-475.

Voogt, N., M. Raes, W. J. B. Wannet, A. M. Henken and A. W. Van De Giessen (2001). Comparison of selective enrichment media for the detection of *Salmonella* in poultry faeces. Letters in Applied Microbiology 32(2): 89-92.

Waage, A. S., T. Vardund, V. Lund and G. Kapperud (1999). Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. Applied and Environmental Microbiology 65(4): 1636-1643.

Waldroup, A., B. Rathgeber and N. Imel (1993). Microbiological Aspects of Counter Current Scalding. The Journal of Applied Poultry Research 2(3): 203-207.

Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10(4): 506-513.

Wang, G. H., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. L. Woodward and F. G. Rodgers (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. Journal of Clinical Microbiology 40(12): 4744-4747.

Wang, W. C., Y. B. Li, M. F. Slavik and H. A. Xiong (1997). Trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride spraying on chicken skin to reduce attached *Salmonella typhimurium*. Journal of Food Protection 60(8): 992-994.

Warriss, P. D., L. J. Wilkins, S. N. Brown, A. J. Phillips and V. Allen (2004). Defaecation and weight of the gastrointestinal tract contents after feed and water withdrawal in broilers. British Poultry Science 45(1): 61-66.

- Whyte, P., J. D. Collins, K. McGill, C. Monahan and H. O'Mahony (2001). The effect of transportation stress on excretion rates of *Campylobacter* in market-age broilers. Poultry Science 80(6): 817-820.
- Whyte, P., K. McGill and J. D. Collins (2003). An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses. Food Microbiology 20(1): 111-117.
- Wieczorek, K. and J. Osek (2015). Poultry flocks as a source of *Campylobacter* contamination of broiler carcasses. Polish Journal of Veterinary Sciences 18(1): 101-106.
- Williams, M. S., E. D. Ebel and H. D. Allender (2015). Industry-level changes in microbial contamination on market hog and broiler chicken carcasses between two locations in the slaughter process. Food Control 51: 361-370.
- Wingstrand, A., J. Neimann, J. Engberg, E. M. Nielsen, P. Gerner-Smidt, H. C. Wegener and K. Molbak (2006). Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. Emerging Infectious Diseases 12(2): 280-284.
- Yang, H., Y. B. Li and M. G. Johnson (2001). Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. Journal of Food Protection 64(6): 770-776.
- Yang, Z. P., Y. B. Li and M. Slavik (1998). Use of antimicrobial spray applied with an inside-outside birdwasher to reduce bacterial contamination on prechilled chicken carcasses. Journal of Food Protection 61(7): 829-832.
- Zhang, L., J. Y. Jeong, K. K. Janardhanan, E. T. Ryser and I. Kang (2011). Microbiological Quality of Water Immersion-Chilled and Air-Chilled Broilers. Journal of Food Protection 74(9): 1531-1535.
- Zhang, Q. Q., K. P. Ye, X. L. Xu, G. H. Zhou and J. X. Cao (2012). Comparison of excision, swabbing and rinsing sampling methods to determine the microbiological quality of broiler carcasses. Journal of Food Safety 32(1): 134-139.
- Zou, W., W. J. Lin, S. L. Foley, C. H. Chen, R. Nayak and J. J. Chen (2010). Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profiles for Identification of *Salmonella* Serotypes. Journal of Clinical Microbiology 48(9): 3122-3126.
- Zweifel, C., D. Althaus and R. Stephan (2015). Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. Food Control 51: 37-42.

## 10 Anhang

### Tabellen

**Tabelle 38: Ergebnistabelle für die MPN-Anzahl an *Campylobacter* spp. in den Nackenhautproben (modifiziert nach ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E))**

Menge (g)	Wachstum von bestätigten <i>Campylobacter</i> spp.								
10 <sup>-1</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MPN/g	0	23	230	2300	23000	230000	2300000	24000000	∞

**Tabelle 39: Ergebnistabelle für die MPN-Anzahl an *Campylobacter* spp. in den Brühwasser- und Blinddarmproben (modifiziert nach ISO/TS 10272-3:2010/Cor.1:2011(E))**

Menge (g)	Wachstum von bestätigten <i>Campylobacter</i> spp.								
10 <sup>0</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-1</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MPN/g	0	2,3	23	230	2300	23000	230000	2400000	∞

**Tabelle 40: Anzahl an *Campylobacter* spp. der Blinddarm-, Brühwasser- und Nackenhautproben bei drei Herden in Betrieb A (Herde A1, A3 und A4) und vier Herden in Betrieb B (Herde B1, B2, B3 und B4). Die Werte sind durch mathematisches Runden auf- oder abgerundet**

Betrieb	Probe (Anzahl)	Minimum	25 %-Quartil	Median	75 %-Quartil	Maximum
A	BD (n=15)	3,4	5,4	6,4	≥7,4*	≥7,4*
	BW (n=9)	0	0	0	3,4	4,4
	R (n=15)	2,4	2,4	3,4	3,4	4,4
	E (n=15)	1,4	2,4	2,4	3,4	7,4
	W (n=15)	2,4	2,4	2,4	3,4	4,4
	K (n=15)	1,4	2,4	3,4	4,4	5,4
B	BD (n=20)	0	0	2,4	≥7,4*	≥7,4*
	BW (n=12)	0	0,4	2,4	3,4	4,4
	R (n=20)	0	1,6	2,4	3,1	4,4
	E (n=20)	1,4	2,4	3,4	4,1	4,4
	W (n=20)	0	1,4	2,4	4,1	4,4
	K (n=20)	0	1,6	2,4	3,4	4,4

BD=Blinddarmproben; BW=Brühwasserproben; Nackenhautproben (R=nach Rupfen, E=nach Eviszation, W=nach Waschen, K=nach Kühlen); Brühwasserproben in log MPN/ml; Nackenhaut- und Blinddarmproben in log MPN/g; \* obere Nachweisgrenze

### Publikationsverzeichnis

Rossow, M., Maurischat, S., Malorny, B., Gölz, G., Alter, T., Pichner, R. (2015): Kontamination von Schlachttierkörpern mit *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. in zwei deutschen Broilerschlachtbetrieben. Vortrag. 15. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, 15. – 17. April, Freising.

Rossow, M., Maurischat, S., Malorny, B., Gölz, G., Alter, T., Pichner, R. (2014): Vergleichende Untersuchungen zu Kontaminationsquellen von *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. in der Broilerschlachtung. Poster. 55. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG – Dreiländertagung, 23. – 26. September, Garmisch-Partenkirchen.

Pichner, R., Rossow, M., Maurischat, S., Malorny, B., Gölz, G., Alter, T., Voetz, M., Mergemeier, S. (2014): Development of innovative process integrated microbiological stage control systems for the reduction of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in meat production (“InnoStep”). Vortrag. ECVPH Annual Conference 2014, University of Copenhagen, 06. – 08. September, Kopenhagen, Dänemark.

Maurischat, S., Rossow, M., Ellerbroek, L., Pichner, R., Malorny, B. (2014): Prävalenz und Kontaminationsrisikofaktoren für *Salmonella* spp. in Hähnchen und Hähnchenfleisch in Deutschland und der Europäischen Union. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 128, Heft 1/2.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Thomas Alter für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die stets schnelle Korrektur und für das motivierende Feedback.

Frau Prof. Dr. Rohtraud Pichner für die freundliche Unterstützung, die hilfreichen Anregungen, das Korrekturlesen und für die schöne Zeit im Institut.

Allen technischen Assistenten, die mir wertvolle Unterstützung bei den Probenahmen und im mikrobiologischen Labor leisteten. Insbesondere danke ich: Frau Doris Trapper, Herrn Peter Richter, Frau Tina Schobert, Frau Elke Gardill, Frau Liane Weber, Frau Susanne Büchs und Frau Gina Krappmann.

Allen Projektpartnern, die unterstützend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Ich danke: Frau Dr. Greta Gölz für die freundliche und kompetente Beantwortung meiner Fragen sowie für die wertvollen Tipps. Frau Dr. Christina Böhnlein, Herrn Dr. Sven Maurischat und Herrn PD Dr. Burkhard Malorny für die gute Zusammenarbeit im Projekt.

Den Mitarbeitern der Qualitätssicherung der Schlachthöfe für die Hilfe bei der Organisation und Durchführung der Probenahmen.

Herrn Dr. Michael Judas für die kompetente Beratung bei allen statistischen Fragen.

Dir Kathrin, für deine liebevolle Unterstützung und dafür, dass du immer für mich da bist.

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Leipzig, den 17.12.2015

Marko Rossow