

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

**Einsatz von kulturellem Nachweis nach JOHNSON & MURANO und Multiplex-PCR nach
HARMON & WESLEY zur Ermittlung des Vorkommens von *Arcobacter* spp. bei
Frischgeflügel und Rinderhack im Berliner Einzelhandel**

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

vorgelegt von
Angela Stubbe, geb. Rohder
Tierärztin
aus Bad Segeberg

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3505

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Alter
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Arco bacter, food contamination, poultry meat, beef, isolation, identification

Tag der Promotion: 02.09.2011

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: 978-3-86387-048-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

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 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht

- ROHDER, A., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (29.9-2.10.2003)
Einsatz von modifiziertem kulturellen Nachweis nach JOHNSON & MURANO und Multiplex PCR nach HARMON & WESLEY zur Ermittlung des Vorkommens von *Arcobacter* spp. bei Frischgeflügel und Rindergehacktem aus dem Berliner Einzelhandel
44. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, Vortrag, Tagungsband S. 169-174
- ROHDER, A., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (7. – 11.6.2004)
Use of cultural detection methods by JOHNSON & MURANO and multiplex PCR by HARMON & WESLEY for the detection of *Arcobacter* spp. in fresh poultry and ground beef bought from Berlin retailers
5th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, Poster (35/32)
Abstracts P-B07, S. 154; Proc. Vol.IV, 979-980
- ROHDER, A., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., RAUSCHER K. (15.07.2004)
Einsatz von modifiziertem kulturellen Nachweis nach JOHNSON & MURANO und Multiplex PCR nach HARMON & WESLEY zur Ermittlung des Vorkommens von *Arcobacter* spp. bei Frischgeflügel und Rindergehacktem aus dem Berliner Einzelhandel
Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie, Fachhochschule Lippe/Lemgo, Tagungsband, Poster (36/33),1 Seite ohne Seitenzahl,
- FU Pressemitteilung (Nr. 025/2004), im Internet zugänglich unter http://www.fu-berlin.de/presse/wissenschaft_pdw/pdw04/pdw_04_025.html
- ROHDER, A., KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (2007)
Using microbiological analysis by JOHNSON & MURANO and Multiplex PCR by HARMON & WESLEY for the identification of *Arcobacter* spp. in fresh poultry and minced beef sold in retail markets in Berlin
Archiv für Lebensmittelhygiene **58**, 188–191 (2007)

Meinem Mann Bernhard Stubbe
und
meiner Freundin Ute Pelz
gewidmet

I	Inhaltsverzeichnis	
1	Einleitung	001
2	Literatur	002
2.1	Taxonomische Einordnung	002
2.2	Charakterisierung von <i>Arcobacter</i> spp.	009
2.3	Vorkommen und Gefährdungspotential	011
2.3.1	Vorkommen beim Tier	012
2.3.2	Vorkommen beim Menschen	017
2.3.3	Vorkommen im Wasser	018
2.3.4	Umweltassoziierte <i>Arcobacter</i> spp.	020
2.4	Nachweis in Lebensmitteln	020
2.4.1	Rind- und Schweinefleisch	020
2.4.2	Geflügelfleisch	021
2.4.3	Vergleichende Untersuchungen	023
2.4.4	Weitere Lebensmittel	026
2.5	Isolierungsmethoden und Identifizierung von <i>Arcobacter</i> spp.	027
2.5.1	Kulturelle Nachweismethoden	027
2.5.2	Molekularbiologische Untersuchungsmethoden	032
2.5.3	Weitere Nachweismethoden	037
2.6	Tenazität von <i>Arcobacter</i> spp.	038
2.6.1	Einfluss der Temperatur	038
2.6.2	Einfluss des pH-Wertes	041
2.6.3	Einfluss des a_w -Wertes	042
2.6.4	Einfluss von Säuren und Konservierungsmitteln	043
2.6.5	Einfluss von Bestrahlung	045
2.6.6	Verhalten gegenüber Metallen	045
2.6.7	Antibiotika	046
2.7	Pathogenese	046
3	Material und Methoden	048
3.1	Kultureller Nachweis von <i>Arcobacter</i>	049
3.1.1	Medien	049
3.1.2	Probenaufbereitung und Kultivierung	054

3.1.3	Isolierung, Differenzierung und Auswertung	055
3.1.4	Standardkeimprofil des institutseigenen Routinelabors	058
3.2.	PCR-Nachweis	059
3.2.1	Reaktionsansatz und Amplifikation	059
3.2.2	Analyse der Amplifikate	063
3.3	Übersicht Vorversuche – Hauptversuch	064
4	Ergebnisse und Diskussion	068
4.1	Vorversuche zur Optimierung der Methoden	068
4.1.1	Vorversuch I: Referenzstämme	068
4.1.2	Vorversuch II: Gesamtstatus und Wiederfindungsrate	072
4.1.3	Vorversuch III: <i>Arcobacter</i> -Anzucht unter Bedingungen für <i>Campylobacter</i>	076
4.1.4	Vorversuch IV: Etablierung der molekularbiologischen Untersuchung	077
4.1.5	Vorversuch V: Lebensmittelproben	078
4.1.6	Vorversuch VI: Optimierte Vorgehensweise	079
4.2	Hauptversuch	080
4.2.1	Übersicht Gesamtproben Rind/Huhn	080
4.2.2	Einzelergebnisse	082
4.3	Eignung der Untersuchungsmethoden	085
4.3.1	JOHNSON & MURANO	085
4.3.2	HARMON & WESLEY	086
5	Schlussfolgerungen	088
5.1	Eignung der Untersuchungsmethoden	088
5.2	Kontamination von Rind und Huhn mit <i>Arcobacter</i>	089
6	Zusammenfassung	091
7	Summary	092
8	Literaturverzeichnis	093

9	Anhang	129
	Nährmedien für die mikrobiologische Untersuchung	129
	Nährbödenherstellung	129
	Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien	129
	Danksagung	145
	Selbstständigkeitserklärung	146

II Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arcobacter</i>
AFLP	Amplified fragment length polymorphism, amplifizierter-Fragment-Längen-Polymorphismus
Aqua dest.	Aqua destillata
BHI	Brain heart infusion
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Campylobacter</i>
CAT	Cefoperazone Amphotericin Teicoplanin
CCDA	Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar
DNA	desoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
IAH	Indoxyl Acetat Hydrolyse
incl.	inclusive
JM	JOHNSON und MURANO
kGy	Kilogray
mCCDA	modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar
MIC	Minimum inhibitory concentration, Minimale Hemmkonzentration (MHK)
min	Minuten
mPCR	Multiplex-PCR
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PC	Plate Count
PCR	Polymerase chain reaction
PGFE	Pulse-field gel electrophoresis,
RAPD	Random amplified polymorphic DNA,
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
s.	siehe
spp.	Spezies
v. a.	vor allem

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie von <i>Campylobacter</i> spp. (GARRITY et al. 2004)	003
Abbildung 2: Schema der PCR-Gelelektrophorese	064
Abbildung 3: Fließschema Vorversuch V und VI	066
Abbildung 4: Fließschema Hauptversuch	067
Abbildung 5: Kontaminationsraten der untersuchten Proben: Vor- und Hauptversuche [%]	081
Abbildung 6: <i>Arcobacter</i> Nachweisrate in Hähnchenschenkeln im Hauptversuch gegliedert nach konventioneller und ökologischer Haltung [%]	084

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Phänotypische Charakteristika der derzeit anerkannten <i>Arcobacter</i> Spezies – zitiert nach COLLADO GONZALES (2010)	011
Tabelle 2:	Nachweisraten von <i>Arcobacter</i> spp. in rohen Geflügelteilstücken mit Haut (n=82) und Hackfleisch (n=54) (Nachweisgrenze: 10 KbE/g) (aus Bartholomä und NAUMANN, 2006)	024
Tabelle 3:	Übersicht zur Verbreitung von <i>Arcobacter</i> spp. bei rohem Fleisch aus dem Einzelhandel	025
Tabelle 4:	D-Wert Ermittlung von D´SA & HARRISON (2005) und HILTON et al. (2001) unter verschiedenen Bedingungen	040
Tabelle 5:	Primer Sets für die Multiplex-PCR	059
Tabelle 6:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Amplifizierung	061
Tabelle 7:	Übersicht Vorversuche – Hauptversuch	065
Tabelle 8:	Anzucht von <i>Arcobacter</i> auf neutralen Medien	070
Tabelle 9:	Biochemische Differenzierung der Referenzstämme	071
Tabelle 10:	Gramfärbung der Referenzstämme und Keimmorphologie	071
Tabelle 11:	Standardkeimprofil von Rinderhack- und Hähnchenschenkelproben - arithmetisches Mittel in [KbE/g]	074
Tabelle 12:	Makroskopische Bewertung der Proben auf JM-Platten	075
Tabelle 13:	Wiederfindungsrate der <i>Arcobacter</i> -Stämme (quantitativ)	076
Tabelle 14:	Wiederfindungsrate PCR und kulturelles Verfahren (qualitativ; n=16) [%]	079
Tabelle 15:	Gesamtübersicht der Versuchsergebnisse: Anzahl der <i>Arcobacter</i> -positiven Proben	081
Tabelle 16:	<i>Arcobacter</i> Nachweisrate bei Hähnchenfleisch im Hauptversuch	083
Tabelle 17:	Inkubationsbedingungen der verwendeten Nährböden	144

1 Einleitung

Eine wesentliche Aufgabe des Verbraucherschutzes ist es, die Bedeutung von „emerging pathogens“ möglichst frühzeitig abzuschätzen. „Emerging“ steht im Englischen für „auftauchen“, „sich herausstellen“. Unter „emerging pathogens“ versteht man somit Krankheitserreger, die bislang unbekannt waren oder als ungefährlich galten, sich dann jedoch als mindestens potentiell krankmachend erweisen. Zu dieser Gruppe zählt auch die Gattung *Arcobacter*.

Ursprünglich isoliert aus abortierten Schweine- und Rinderfeten (ELLIS, 1977), werden *Arcobacter* spp. mittlerweile auch für Enteritiden und Abdominalkrämpfe bei Menschen verantwortlich gemacht. Eine Übertragung kann durch Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch und ggf. auch durch Trinkwasser erfolgen.

Die Bedeutung dieser Gattung als Gesundheitsgefahr lässt sich noch nicht abschließend beurteilen. Es ist aber nicht unwahrscheinlich, dass die Risikobewertung eine ähnliche Entwicklung nimmt, wie es einst in der Einschätzung von *Campylobacter* spp. der Fall war. Diesen Bakterien ähneln *Arcobacter* spp. so sehr, dass sie zunächst sogar in die gleiche Gattung eingestuft wurden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Nachweismöglichkeit von *Arcobacter* spp. zu überprüfen sowie Daten über ihre Häufigkeit in frischen Hähnchenkeulen und Rinderhack aus dem Berliner Einzelhandel kulturell und molekularbiologisch zu gewinnen. Es wurden dazu Proben aus konventioneller Haltung mit Fleisch aus biologischer Haltung verglichen. Wie in der Literaturübersicht dargestellt, gibt es in der Routinediagnostik derzeit noch keine standardisierte Untersuchungsmethode für *Arcobacter*. Als Nachweisverfahren wurden die von JOHNSON und MURANO (1999a, b) empfohlene kulturelle Methode und die von HARMON und WESLEY (1997) speziesspezifische Multiplex-PCR (mPCR) Analyse ausgewählt.

2 Literatur

2.1 Taxonomische Einordnung

Die taxonomische Einordnung von Mikroorganismen erfolgte ursprünglich über morphologische und biochemische Kriterien, bevor molekularbiologische Methoden eine weitere Differenzierung ermöglichten. Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft blicken *Campylobacter* und *Arcobacter* auf eine gemeinsame Geschichte zurück. Die Gattung *Arcobacter*, früher als aerotolerante *Campylobacter* bezeichnet, ist seit 1992 aufgrund ihrer Thermo- und Aerotoleranz als *Arcobacter* spp. einem eigenen Genus innerhalb der Familie der *Campylobacteraceae* zugeordnet worden.

Zunächst erfolgte bei *Campylobacter* spp. aufgrund morphologischer Kriterien eine Einordnung in die Gattung *Vibrio* (SMITH und TAYLOR, 1919). SEBALD und VÉRON trafen 1963 die Entscheidung, *Vibrio fetus* und „closely related vibrios“ von der Spezies *Vibrio cholerae* wegen ihres niedrigen GC-Gehaltes der DNA abzugrenzen (*Vibrio fetus*: $34,3 \pm 0,6$ mol %; *Vibrio cholerae*: $47,2 \pm 0,7$ mol %). Sie gaben diesen mikroaerophilen, nicht fermentierenden Vibrionen den Namen *Campylobacter*.

Die Gattung *Campylobacter* verhielt sich jedoch phänotypisch und genotypisch uneinheitlich. Daraus resultierten einerseits unterschiedliche Nomenklatur-Systeme (VÉRON und CHATELAIN, 1973; SMIBERT, 1974) und andererseits neu beschriebene Spezies. Nach elektronenmikroskopischen Vergleichsuntersuchungen von *Vibrio fetus* und *Spirillum serpens* wurde die Gattung *Campylobacter* der Familie der *Spirillaceae* zugeordnet (RITCHIE et al., 1966). Erkenntnisse über kulturelle Unterschiede (SKIRROW und BENJAMIN, 1980), verschiedene anaerobe Stoffwechselfähigkeiten (RAZI und PARK, 1982; VÉRON und LENVOISÉ-FURET, 1982) und unterschiedliche zelluläre Fettsäurezusammensetzungen (BLASER et al., 1980; CURTIS, 1982; JOHNSON et al., 1982) führten dazu, dass „thermophile“ *Campylobacter* als eigenständige Gruppe betrachtet wurden (SKERMAN et al., 1980). Innerhalb dieser thermophilen *Campylobacter*-Spezies wurde zwischen *C. jejuni* und *C. coli* differenziert (SKIRROW und BENJAMIN, 1980).

Anfang der 90er-Jahre erfolgte auf der Grundlage genetischer Untersuchungen eine Revision bezüglich der Nomenklatur (VANDAMME und DE LEY, 1991; VANDAMME und GOOSENS, 1992). Die *Campylobacteraceae* wurden als neue Familie eingeführt, welche sich in die beiden Gattungen *Campylobacter* und *Arcobacter* gliederte. Zu diesem Zeitpunkt waren *Campylobacter* (*C.*) *butzleri*, *C. cryaerophilus*, *C. skirowii* und *C. nitrofigilis* bekannt, die

dann den Genusnamen *Arcobacter* erhielten. Die Gattung *Helicobacter* war bereits 1989 aufgrund abweichender phänotypischer und genotypischer Eigenschaften abgegrenzt worden (GOODWIN et al., 1989). *Arcobacter* spp. unterscheiden sich von *Campylobacter* spp. durch ihre Sauerstofftoleranz und das Wachstum bei niedrigen Temperaturen von +15°C bis +25°C (VANDAMME et al., 1992a).

Nach neueren Veröffentlichungen von Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, 2nd edition (GARRITY et al., 2004), untergliedert sich die Familie der *Campylobacteraceae* in Gattung I *Campylobacter*, Gattung II *Arcobacter*, Gattung III *Dehalospirillum* und Gattung IV *Sulfurospirillum*.

In der Abbildung 1 werden *Campylobacter* spp. nach der aktuellen Taxonomie von Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology dargestellt.

REGUM: BACTERIA/ARCHAEA			
Phylum BXII: <i>Proteobacteria phy. nov.</i>			
Classis: <i>Epsilonproteobacteria</i>			
Ordo I: <i>Campylobacterales</i>			
Familia I: <i>Campylobacteriaceae</i>			
Genus I: <i>Campylobacter</i>			
Genus II: <i>Arcobacter</i>			
Genus III : <i>Dehalospirillum</i>			
Genus IV: <i>Sulfurospirillum</i>			
Familia II: <i>Helicobacteraceae</i>			

Abbildung 1: Taxonomie von *Campylobacter* spp. (nach GARRITY et al., 2004)

In der Gattung *Arcobacter* sind die folgenden Spezies beschrieben: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* sowie neuerdings *A. cibarius* und *A. thereuis* konnten aus Mensch oder Tier isoliert werden und gelten als Pathogene. *A. butzleri* wird in dieser Reihe als primärer menschlicher Krankheitserreger angesehen (HSUEH et al., 1997). Hingegen sind *A. nitrofigilis*, *A. halophilus* und *A. mytili* sp. nov. umweltassoziiert und werden als Nicht-

Pathogene verstanden (MCCLUNG et al., 1983; VANDAMME et al., 1991; DONACHIE et al., 2005; HOUF et al., 2005; COLLADO et al., 2009a; HOUF et al., 2009). Darüber hinaus finden sich verschiedene Spezies, die z. T. noch nicht abschließend zugeordnet werden konnten, wie z. B. *Candidatus Arcobacter sulfidicus* (WIRSEN et al., 2002).

Arcobacter nitrofigilis, bis zur Revision der Taxonomie durch VANDAMME et al. (1991) als *Campylobacter nitrofigilis* bezeichnet, wurde bereits 1983 als erste der späteren *Arcobacter*-Arten von McClung beschrieben, dem die Isolation dieses Keimes von den Wurzeln der Salzmarschpflanze *Spartina alterniflora* gelang. Kennzeichnend für das gram-negative Stäbchenbakterium mit einer Länge von 1 bis 3 µm und einer Breite von 0,2 bis 0,9 µm gelten ein als „Darting“ bezeichneter Bewegungsmodus, d. h. die Motilität stellt sich in einem schnellen, zickzackförmigen Flitzen dar. Wie später auch für die weiteren *Arcobacter* spp. nachgewiesen, verhielt sich *A. nitrofigilis* chemoorganotroph. Eine Kolonieentwicklung bei Zusatz von 1 % Glycin fand nicht statt.

NEILL et al. veröffentlichten 1985 eine Studie mit umfangreichen Untersuchungen zu *Campylobacter* spp. und noch nicht weiter zugeordneten Stämmen, die überwiegend aus Aborten angezüchtet worden waren. Besonders hervorstechend war die Fähigkeit der nicht eingruppierten Isolate, bei niedrigeren Temperaturen und gleichermaßen microaerob wie auch bei einer höheren Sauerstoffkonzentration zu wachsen. Daher schlugen die Autoren vor, diese Bakterien einer neuen Gruppe mit der Bezeichnung *Campylobacter cryaerophilus* zuzuordnen. Alle untersuchten Stämme zeigten eine geringe biochemische Aktivität und insgesamt eine genetische Ähnlichkeit. Diese übereinstimmenden Merkmale waren innerhalb der Gruppe der aerotoleranten *Campylobacter* stärker ausgeprägt als zu den anderen *Campylobacter* spp. NEILL et al. charakterisierten *C. cryaerophila* als gram-negative, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien mit einer Breite von 0,4 µm und einer Länge von 1,8 µm, vereinzelt bis zu 20 µm. Sie waren beweglich („Darting“ Bewegungsmodus) und zeigten bei 30°C unter verminderter Sauerstoffspannung kleine (Durchmesser 1 mm), glatte und konvex geformte Kolonien. Einzelne Stämme wuchsen im gesamten Bereich zwischen 5 und 40°C, alle zeigten Koloniebildung bei 15°C. Der Katalase- und Oxidase Test verliefen positiv, die meisten waren in der Lage, Nitrat zu reduzieren. Es ließ sich eine Toleranz gegenüber 2 % NaCl, 4 % Glucose und 0,1 % Glycin feststellen, beim Einsatz von 1 % Glycin hingegen konnte kein Wachstum mehr nachgewiesen werden. Diverse weitere Tests, wie z. B. Voges-Prosgauer, Indol-, Ornithin- oder Lysinproduktion, ergaben einen negativen Befund.

Aus den Untersuchungen von KIEHLBAUCH et al. (1991a) an aerotoleranten *Campylobacter* spp. ergaben sich zwei DNA Verwandtschaftsgruppen. Die erste Gruppe, für welche die Bezeichnung *Campylobacter butzleri* vorgeschlagen wurde, zeigte lediglich eine schwache bis keine Reaktion im Katalase Test, ein Wachstum auch noch auf 1 % Glycin sowie auf MacConkey Agar sowie Aerotoleranz bei 30 und 36 °C. Weiterhin reagierten die Keime empfindlich auf Nalidixinsäure und resistent auf Cephalotin. Letzteres hatten sie mit der zweiten Gruppe, *Campylobacter cryaerophilus*, gemeinsam, diese wuchsen jedoch, wie z. T. auch bereits von NEILL et al. (1985) berichtet, nicht bei Zusatz von 1 % Glycin und auch nicht auf MacConkey Agar, jedoch ließ sich eine deutliche Reaktion im Katalase Test nachweisen. Weiterhin ergaben die Untersuchungen, dass bei *C. cryaerophilus* im Phänotyp zwei Gruppen - 1A und 1B genannt - zu unterscheiden sind, deren genetische Differenz jedoch nicht so ausgeprägt war, dass die Zuordnung in eine weitere, neue Gruppe in Erwägung gezogen wurde.

Die Namensgebung von *C. butzleri* erfolgte zu Ehren des Mikrobiologen Jean-Paul Butzler, der sich erfolgreich in der Entwicklung selektiver Nährmedien für die Isolation von *Campylobacter jejuni* und *C. coli* engagiert hatte. Weitere Eigenschaften von *C. butzleri* wurden in der Studie von KIEHLBAUCH et al. (1991a) ermittelt, u. a. keine Verstoffwechslung von Glucose durch diese Keime, Wachstum der überwiegenden Mehrheit der Stämme bei Zusatz von 1,5 % NaCl, bei über der Hälfte sogar bei Zusatz von 3,5 % NaCl sowie Reduktion von Nitrat, nicht jedoch von Nitrit. Im Rahmen einer weiten Temperaturspanne von 15, 25, 30, 36 und 40°C konnten die *C. butzleri* Stämme sich vermehren, einzelne zeigten sogar schwaches Wachstum bei 42°C. Bei 5°C ließ sich keine Vermehrung feststellen. Unter anaeroben Bedingungen wurde eine minimale Koloniebildung beobachtet.

Nach eingehender Untersuchung durch DNA-DNA Hybridisierung und Immunotypisierung erfolgte 1991 die Revision der Taxonomie von *Campylobacter*, *Helicobacter* und *Wollinella* durch VANDAMME et al. (1991b). Im Zuge dieser Neueinstufung wurde das Genus *Arcobacter* als eigenständige Gattung innerhalb der rRNA Superfamilie VI etabliert, der *Campylobacter nitrofigilis* (jetzt *Arcobacter nitrofigilis*), *Campylobacter cryaerophilus* (jetzt *Arcobacter cryaerophilus*) sowie eine weitere, noch nicht näher benannte Gruppe aerotoleranter *Campylobacter* zugeordnet wurden.

Aufgrund der DNA-Homologie wurde auch *C. butzleri* der Gattung *Arcobacter* als *A. butzleri* zugerechnet und aus den noch nicht näher bestimmten aerotoleranten *Campylobacter* spp. *A. skirrowii* als neue Art vorgeschlagen. Diese Stämme wurden isoliert aus der

Präputialflüssigkeit von Bullen, Rinder- und Schweineaborten sowie Kotproben von an Diarrhoe erkrankten Lämmern (VANDAMME et al., 1992a).

A. skirrowii zeigte eine leichte Alphahämolyse, die bei den anderen *Arcobacter* spp., ausgenommen vereinzelt bei *A. butzleri*, nicht nachgewiesen wurde, weiterhin eine positive Katalase Aktivität und Nitrat Reduktion, kein Wachstum auf MacConkey Agar aber in der Mehrzahl (78 % der getesteten Stämme) Wachstum bei Zusatz von 1 % Glycin und 3,5 % NaCl (61 % der Teststämme). Alle Isolate reagierten empfindlich gegenüber Nalidixinsäure und 78 % gegenüber Cephalothin. Somit weist *A. skirrowii* gegenüber diesem Antibiotikum die höchste Empfindlichkeit innerhalb dieser Gattung auf.

Zusammenfassend beschrieben VANDAMME et al. (1992a), dass die bis dahin bekannten *Arcobacter* Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* und *A. nitrofigilis* alle gram-negative, gebogene und bewegliche Stäbchenbakterien sind, die microaerob bei 25 und 30°C, sowie aerob bei 30°C Vermehrung zeigen, Indoxylacetat hydrolysieren können und im Oxidase Test ein positives Ergebnis aufweisen. Negative Ergebnisse hingegen ergeben die Hippurathydrolyse, Ureaseaktivität und Fermentation oder Oxidation von D-Glucose.

Einige der *Arcobacter* Spezies sind erst seit höchstens 5 Jahren bekannt, zu anderen liegen ganz aktuelle Erkenntnisse über ihre systematische Zuordnung vor. Auf die entsprechenden Publikationen soll im Folgenden näher eingegangen werden. So ermittelten in ihrer Studie an Hähnchenschlachtkörpern HOUF et al. (2005) gram-negative, gebogene, nicht-sporenbildene Stäbchenbakterien, die sich nicht mit der *Arcobacter*-spezies-spezifischen PCR identifizieren ließen, sehr wohl aber gemäß der genus-spezifischen PCR von HARMON & WESLEY (1997) der Gattung *Arcobacter* zuzuordnen waren. Auch die angeschlossenen biochemischen Tests unterstützten die Annahme, dass es sich hierbei um eine neue Art handelte, die die Bezeichnung *Arcobacter cibarius* sp. nov. zugewiesen bekam.

In einer dänischen Erhebung von HOUF et al. (2009) über das Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Schweineaborten und Lebensmitteln tierischer Herkunft wurden 8 gram-negative, leicht gebogene, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien durch AFLP Analyse erfasst, die eindeutig einem anderen als den bisher bekannten *Arcobacter* Phänotypen zuzuordnen waren. Diese Einschätzung konnte durch die numerische Analyse des gesamten Zellprotein Profils (numerical analysis of whole cell protein) bestätigt werden. Durch DNA-DNA Hybridisation wurde zwischen diesen Stämmen ein Verwandtschaftsgrad von 79 % sowie zwischen diesen und den *Arcobacter* Referenzstämmen von 41 % oder weniger ermittelt. Beim paarweisen Vergleich der 16S rRNA Gensequenzen erwiesen sich *A.*

cryaerophilus, *A. cibarius* und *A. skirowii* als die engsten phylogenetischen Nachbarn. Schließlich konnte mit DNA Fingerprinting gezeigt werden, dass die acht Isolate einer eigenen, neuen *Arcobacter* Spezies, *Arcobacter thereius* sp. nov., angehörten.

Bei *A. cryaerophilus* handelt es sich um eine heterogene Art, in der bislang zwei Untergruppen beschrieben worden waren. In der Studie von DEBRUYNE et al. aus dem Jahr 2010 erfolgte mittels AFLP und Hitzeschockprotein 60-Gensequenzanalyse eine Neubewertung des taxonomischen Status der Untergruppen. Dabei ergab sich, dass *A. cryaerophilus* eine komplizierte taxonomische Struktur besitzt, die aus mehreren Gruppierungen von Stämmen besteht. Diese teilen sich Zwischenstufen der DNA-DNA Hybridisierung, weisen jedoch nur geringe DNA-DNA-Homologie zu anderen *Arcobacter*-Spezies auf. Die Mehrheit der Stämme gehört einer dieser Gruppierungen an und schließt die meisten Stämme der bisherigen Untergruppe 2 ein. Die Stämme der *A. cryaerophilus*-Untergruppe 1 bilden drei unterschiedliche Gruppierungen, wobei der Referenzstamm eine eindeutig separate Position einnimmt. Aus den Resultaten folgerten DEBRUYNE et al. (2010), dass die gegenwärtige Untergruppen-Einteilung für *A. cryaerophilus* aufgegeben werden sollte und der Referenzstamm genetisch abweichend ist, denn er repräsentiert nur unzureichend diejenigen Isolate, die dieser Spezies angehören.

COLLADO et al. (2009a) entdeckten ebenfalls eine neue Spezies. Es wurden 3 Isolate aus Muscheln und eines aus Brackwasser in Katalonien isoliert, die ein bislang unbekanntes Muster ihrer genetischen Zusammensetzung aufwiesen, wenn sie mit der neuartigen Methode der 16s rRNA RFLP untersucht wurden. Nähere Analysen der 16S rRNA und der *rpoB* Gensequenzen zeigten, dass es sich hier um eine eigene Abstammungslinie innerhalb der Gattung *Arcobacter* handeln musste. Dies konnte durch den geringen DNA-DNA Verwandtschaftsgrad von 16 – 30 % der Isolate mit den Referenzstämmen bestätigt werden.

Die bisher für alle *Arcobacter* spp. positiv getestete Hydrolyse von Indoxylacetat fällt bei den neuen Isolaten negativ aus. Die Empfindlichkeit gegenüber Cefoperazon in Verbindung mit der fehlenden Urease Produktion und Nitrat Reduktion gab Anlass, die Existenz einer weiteren Art mit dem Namen *Arcobacter mytili* sp. nov. (*Mytilus* = Miesmuschel) zu postulieren (COLLADO et al., 2009a).

Damit ist die Entdeckung von *Arcobacter* Arten nicht abgeschlossen. Im Jahre 2010 neu beschrieben wurden *A. marinus* (KIM et al., 2010), *A. trophiarum* (DE SMET et al., 2010b) und *A. defluvii* (COLLADO et al., 2010b).

Bei *A. marinus*, isoliert vor der koreanischen Insel Dokdo, handelt es sich um ein leicht gebogenes, gramnegatives Stäbchenbakterium, für welches die Bezeichnung CL-S1(T) festgelegt wurde. *A. marinus* zeigt gutes Wachstum unter aeroben und microaeroben Bedingungen. Die Analyse der 16S rRNA und *gyrA* Gensequenzen ließ eine Zugehörigkeit zur Gattung *Arcobacter* erkennen. Phylogenetische Studien basierend auf den oben genannten Gensequenzen zeigten, dass der Stamm CL-S1(T) eine stabile Gruppe mit *Arcobacter halophilus* LA31B(T) bildet, wobei die Sequenz Ähnlichkeiten bis zu 96,1 % betragen. Die DNA-DNA Verwandtschaft zwischen CL-S1(T) und *Arcobacter halophilus* LA31B(T) liegt bei 44 %, was indiziert, dass es sich bei CL-S1(T) um eine genetisch eigene Spezies handelt. Die Vermutung wurde auch durch die Analyse der Fettsäuremuster unterstützt. Phänotypisch unterscheidet er sich von *A. halophilus* durch seine Fähigkeit, bei 10°C zu wachsen, hingegen ist eine Vermehrung unter anaeroben Bedingungen nicht möglich. Die Daten dieser Studie ergeben, dass es sich hier um eine neue Spezies in der Gattung *Arcobacter* handelt, für die die Bezeichnung *Arcobacter marinus* sp. nov. vorgeschlagen wird (KIM et al., 2010).

Im Zuge einer Studie von DE SMET et al. zur Aufklärung der Populationsdynamik von *Arcobacter* spp. in Mastschweinen wurde via AFLP eine Gruppe *Arcobacter*, die einen eigenen Genotyp bildeten, ermittelt. In der Genus-spezifischen PCR konnte ein Amplifikat nachgewiesen werden, nicht jedoch in der spezies-spezifischen mPCR. Die DNA-DNA Verwandtschaft lag bei 72 %, die nächsten phylogenetischen Nachbarn sind *A. cryaerophilus*, *A. thereius*, *A. cibarius* und *A. skirrowii*. Weitere Abklärungen folgten, unter anderem die Ermittlung des biochemischen Verhaltens der neuen Spezies namens *Arcobacter trophiarum* sp. nov.: Katalase- und Oxidase-Test verlaufen positiv, ebenso die Reduktion von Nitrat und Indoxylacetat-Hydrolyse. Kein Wachstum ist zu verzeichnen bei 37°C, sehr wohl jedoch in 2-4 % NaCl, auf 0,1 % Natrium-Desoxylat und nicht supplementierten Campylobacter Kohl-Desoxylat Basis Medium. Die Keime zeigen sich resistent gegenüber Cephalothin (32 mg/l) und Cefoperazon (64 mg/l). Zusätzlich wurde eine PCR entwickelt, die den neuen Keim identifizieren kann (DE SMET et al., 2010b).

Ziel der Studie von COLLADO et al. (2010b) war es, die taxonomische Position von Isolaten aus Abwasser Proben zu klären. Mit Hilfe der 16S rDNA-RFLP *Arcobacter* Identifikationsmethode ergab sich ein neues und spezifisches Sequenzmuster. Die größte Ähnlichkeit zeigte sich zu *A. nitrofigilis*. In anschließenden Untersuchungen konnte abgesichert werden, dass es sich bei den Isolaten um eine neue *Arcobacter* Spezies handelt, für die der Name *Arcobacter defluvii* sp. nov. angeregt wurde.

Bereits 1997 wurde von MUSMANNO et al. berichtet, dass oft zwischen verschiedenen Isolaten innerhalb der einzelnen *Arcobacter* Spezies eine sehr deutliche genetische Heterogenität herrscht. Dies konnte durch verschiedene Autoren bestätigt werden (COLLADO GONZALEZ, 2010; HOUF et al., 2001; HUME et al., 2001; ON et al., 2001; VAN DRIESSCHE et al., 2004, 2005). HUME et al. (2001) stellten zur Erklärung dieses Phänomens folgende Hypothese auf: Zum einen könnte die Kolonisation der Tiere durch verschiedene Eltern Genotypen entstehen, zum anderen wären auch Variationen der Eltern Genotypen während der sukzessiven Passagen innerhalb des Tierbestandes denkbar.

2.2 Charakterisierung von *Arcobacter* spp.

Die Vertreter der Gattung *Arcobacter* sind gram-negative, nicht Sporen-bildende Stäbchen von gebogener Form (*Arcobacter* – von arcus: lat. „Bogen“). Sie sind zwischen 1 - 3 µm lang, 0,2 - 0,9 µm breit, jedoch weisen einzelne Spezies eine Länge bis zu 20 µm auf (WESLEY, 1994). Ihren eindrucksvollen, charakteristischen Bewegungsmodus des „darting“, eine zickzackförmige, rasche Vorwärtsbewegung bzw. einer spiralige Bewegung auf der Stelle, realisieren sie durch ihre monotriche, uni- oder bipolare Begeißelung.

Arcobacter-Spezies ähneln phänotypisch den *Campylobacter*-Spezies, mit denen sie auch über phylogenetische Gemeinsamkeiten verfügen (RIVAS et al., 2004). Sie wachsen im Temperaturbereich zwischen 15 und 37°C, das Temperaturoptimum ist für die einzelnen Spezies unterschiedlich, wobei *A. butzleri* am Temperatur-tolerantesten ist und in der ganzen genannten Spanne Wachstum zeigt. Für die Isolierung von *Arcobacter* spp. generell liegt die optimale Inkubationstemperatur bei ca. 30°C (HILTON et al., 2001, BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG 2007). Im Gegensatz zu den pathogenen thermophilen *Campylobacter* spp. wachsen *Arcobacter* spp. bei 42°C auf Blutagar nicht oder nur sehr langsam. Dabei erscheinen die Kolonien sehr fein bis stecknadelkopfgroß, rund, glänzend, flach bis flach konvex und weiß-gelblich. Auch die Bebrütungsdauer spielt eine wichtige Rolle, mindestens 48 Stunden sind für das Wachstum erforderlich. Von HILTON et al. (2001) wurde für *A. butzleri* eine optimale Inkubationszeit von 58 Stunden bei 30°C ermittelt. Der bevorzugte pH-Wert liegt im neutralen Bereich, das pH-Optimum für *A. butzleri* bei 6,0 bis 7,0, für *A. cryaerophilus* bei 7,0 bis 7,5. Unter einem pH-Wert von 5 und über 8,5 wird das Wachstum gehemmt (HILTON et al., 2001; D'SA und HARRISON, 2005). Hinsichtlich der Salzkonzentration variieren die Angaben in der Literatur, D'SA und HARRISON (2005)

ermittelten als maximal tolerierte Salzkonzentration 3,5 % bzw. 3 % für *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*.

Genau wie *Campylobacter*-Spezies bevorzugen diese mikroaerophilen Mikroorganismen für ihr Wachstum eine reduzierte Sauerstoffspannung (3 – 10 % Sauerstoff), sie sind allerdings sehr wohl in der Lage, sich auch unter aeroben Bedingungen zu vermehren. Die wesentlichen Unterscheidungsmöglichkeiten bei der kulturellen Isolierung von *Arcobacter* zu *Campylobacter* bildet die Fähigkeit der *Arcobacter* spp., in aeroben Milieu und bei niedrigeren Temperaturen zu wachsen (VANDAMME und DE LEY, 1991). Trotzdem werden sie, genau wie *Campylobacter* spp., in der englischsprachigen Literatur gern als „fastidious“ beschrieben, dem deutschen „heikel“ entsprechend, was die zum Teil sehr schwierige Anzucht ausgesprochen gut charakterisiert (WYBO et al., 2004; CERVENKA et al., 2008).

Derzeit existieren keine standardisierten Isolierungsmethoden zum Nachweis von *Arcobacter* spp. Aus den analytischen Problemen resultiert die begrenzte Kenntnis über das Vorkommen von *Arcobacter* spp. nicht nur in Lebensmittel, sondern auch in anderen Quellen; bereits erhobene Daten lassen sich nur schwerlich vergleichen (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2007).

Biochemische Tests zur Phänotypisierung der *Arcobacter* Spezies haben ihre Grenzen (KIEHLBAUCH et al., 1991; NACHAMKIN, 1995, ON, 1996). Lediglich im Oxidasetest zeigen zuverlässig alle Arten eine positive Reaktion. Bis zur Entdeckung von *A. mytili* galt die Hydrolyse von Indoxylacetat als zuverlässiges Kriterium bei der Identifizierung von *Arcobacter* spp. Auch zur Katalase Aktivität sind *Arcobacter* überwiegend fähig, ausgenommen *A. cibarius* (54 % der Stämme positiv) und *A. butzleri* (33 % der Stämme positiv), darüber hinaus fällt bei anderen *A. butzleri* Stämmen die Reaktion sehr schwach aus (HOUF et al., 2005). Somit können *Arcobacter* spp. über biochemische Tests kaum von anderen Erregern abgegrenzt werden. Eine Übersicht über die phänotypischen Eigenschaften bietet Tabelle 1.

Arcobacter sind chemoorganotroph (HENSYL, 1994), d. h. sie können keine Kohlenhydrate verwerten, sondern nutzen stattdessen als Energiequelle organische Säuren, z. B. Pyruvat, und Aminosäuren (JOHNSON und MURANO, 1999a). Diese empfindlichen Keime stellen also nicht nur hohe Ansprüche an ihre Wachstumsbedingungen (HO et al., 2006b), sondern somit auch an diejenigen, die sie isolieren und identifizieren möchten.

Tabelle 1: Phänotypische Charakteristika der derzeit anerkannten *Arcobacter* Spezies^a -

zitiert nach COLLADO GONZALEZ (2010)

Charakteristik a	A. <i>butzleri</i>	A. <i>cryaerophilus</i>	A. <i>skirrowii</i>	A. <i>cibarius</i>	A. <i>thereus</i>	A. <i>nitrofigilis</i>	A. <i>mytilus</i>	A. <i>halophilus</i>	A. <i>marinus</i>
Katalase Aktivität	V	+	+	V	+	+	+	-	-
Urease Aktivität	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Nitrat Reduktion	+	+ ^b	+	-	+	+	-	+	+
Indoxyl Acetat Hydrolyse	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Wachstum									
O ₂ bei 37°C	+	V	+	-	-	V	+	+	+
mO ₂ bei 37°C	+	V	+	+	-	-	+	+	+
Medien mit 1% Glycin	-	-	-	-	+	-	+ ^d	-	NB
4% (W/V) NaCl	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Mac Conkey Agar	+	V	-	+	V	-	+	-	NB
Minimal Medien	+	- ^c	-	+	+	-	-	-	NB
Resistenz gegen Cefoperazon (64mg l ⁻¹)	+	+	+	+	+	-	-	-	-

^a Daten von ON et al. 1996; DONACHIE et al. 2005; HOUF et al., 2005, 2009; COLLADO et al., 2009a, KIM et al. in press. + ≥95% Stämme positiv; - ≤11% Stämme positiv; V 12-94% Stämme positiv. O₂ aerobe Bedingungen; mO₂ microaerobe Bedingungen; NB nicht bestimmt

^b zwei von vier getesteten Stämmen bei COLLADO et al. (2009) negativ (LMG 9904T und LMG 9065)

^c zwei von vier getesteten Stämmen bei COLLADO et al. (2009) positiv (LMG 7537T und LMG 10241)

^d COLLADO GONZALEZ 2010

2.3 Vorkommen und Gefährdungspotential

In der Routinediagnostik ist eine Untersuchung auf *Arcobacter* spp. bislang noch nicht vorgesehen. Daher sind die Isolationen nur in Einzelfällen bekannt geworden, überwiegend bei Patienten mit enteritischen Erkrankungen, wobei als Symptome v. a. Durchfall und Abdominalkrämpfe vorherrschen. Im Zusammenhang mit gravierenden Vorerkrankungen

entwickelten sich allerdings auch lebensbedrohliche Bakteriämien, daher sollte die Relevanz von *Arcobacter* spp. für Humanerkrankungen nicht unterschätzt werden.

Forschungsschwerpunkte liegen somit in der Abklärung des Vorkommens sowie der Infektionswege von *Arcobacter* spp., in der Literatur werden bislang „mögliche“, „anzunehmende“ und „wahrscheinliche“ Übertragungswege diskutiert (COLLADO GONZÁLEZ, 2010).

Arcobacter spp. konnten aus diversen Quellen nachgewiesen werden, z. B. in Abwässern, Oberflächen- und Trinkwasser sowie einer Reihe von Lebensmitteln. Insbesondere aus solchen tierischer Herkunft, wie Rind-, Schweine- oder Geflügelfleisch, von denen aktuell die Hauptübertragung für den Menschen angenommen wird.

2.3.1 Vorkommen beim Tier

Die Spezies *Arcobacter* (*A.*) *butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* wurden bei Erkrankungen von Tieren besonders mit Aborten und Durchfällen in Zusammenhang gebracht (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2007). Bereits 1977 isolierte ELLIS aerotolerante *Campylobacter*-ähnliche Bakterien aus Rinder- und Schweineaborten, die später, nach weiterführenden Untersuchungen, dem Genus *Arcobacter* zugeschrieben wurden.

Studien in den USA und Brasilien bestätigten das Vorkommen von *Arcobacter* spp. im Zusammenhang mit Aborten und Reproduktionsstörungen bei Schweinen (DE OLIVIERA et al., 1997; SCHROEDER-TUCKER et al., 1996), nachgewiesen wurde *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*. Bei Studien in Dänemark konnten keine klassischen Aborterreger wie *Brucella*, *Leptospira*, PPV, PRRSV nachgewiesen werden, in knapp der Hälfte der untersuchten abortierten Schweinefeten jedoch *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* (ON et al., 2002).

Hinweise auf das invasive Potential von *Arcobacter* spp. ergaben sich nach experimenteller Infektion von Ferkeln, die durch Kaiserschnitt entbunden wurden und keine Kolostralmilch erhielten. *A. butzleri*, ähnlich wie *C. jejuni*, kolonisierten die neugeborenen Ferkel, denn durch Anreicherung im EMJH-P80 Medium (Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris Polysorbat 80) mit anschließender PCR-Analyse, detektierte WESLEY (1996) *Arcobacter* spp. in 40 % der Kotproben dieser klinisch gesunden Ferkel. *In vitro* Studien unter Verwendung von HEp-2 Zellen wiesen ebenfalls auf seine potentielle Virulenz hin (FERNANDEZ et al. 1995).

Bei weitem nicht alle *Arcobacter*-positiven Tiere zeigen auch eine klinische Symptomatik. VAN DRIESSCHE et al. (2004) konnten in Belgien zahlreiche Nachweise in Sauenbeständen führen: 59 % der tragenden Sauen und 85 % der Sauen nach dem Abferkeln erwiesen sich als Träger von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Eine nicht ganz so hohe Durchseuchung ergaben die Studien in Holland von HO et al. (2006a) mit 42 % bzw. von HUME et al. (2001) aus 3 Farmen in den USA mit 7,2 bis 36,4 %. Somit scheinen nicht alle Spezies bzw. Stämme für das Tier pathogen zu sein, da die hohe Nachweisquote nicht mit der erkrankter Tiere korrelierte.

Auch in weiteren Untersuchungen konnten weltweit symptomlose Trägertiere aufgewiesen werden. Kotproben von klinisch gesunden Schweinen (HUME et al., 2001; KABEYA et al., 2003b; VAN DRIESSCHE et al., 2004), Rindern (WESLEY et al., 2000; KABEYA et al., 2003b; ÖNGÖR et al., 2004; VAN DRIESSCHE et al., 2005) sowie Hühnern, Schafen und Pferden (KABEYA et al., 2003b; VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2005) führten zur Isolierung von *Arcobacter* spp., wobei *A. butzleri* dominierte. Ein interessanter Aspekt ist, dass Fütterung, Wasserversorgung und Herdengröße einen Einfluss hinsichtlich der *Arcobacter* Prävalenz nehmen können. WESLEY et al. (2000) ermittelten geringere fäkale Ausscheidungsraten in Milchkuh Herden, wenn diese mit Luzerne und Brauerei-Nebenprodukten gefüttert wurden, ebenso, wenn den Tieren Einzeltränken zur Verfügung standen. In kleineren Herden ergaben sich geringere *Arcobacter* Belastungen als in großen.

In einer Studie aus jüngster Zeit untersuchten VILAR et al. (2010) in Spanien 89 Milchviehhaltungen unter anderem auf die Präsenz von *Arcobacter* spp. Diese konnten bei 68,5 % der Höfe und in 41,7 % der 254 Kotproben nachgewiesen werden, wobei *A. cryaerophilus* die am häufigsten identifizierte Spezies repräsentierte.

Die häufigen Nachweise positiver Fäkalproben von klinisch gesunden Tieren dürfen jedoch nicht darüber hinweg täuschen, dass *Arcobacter* spp. ursächlich an Enteritiden bei Tieren beteiligt sein können. Auf natürlichem Weg mit *Arcobacter butzleri* infizierte Primaten entwickelten eine Colitis (ANDERSON et al., 1993), bei Rhesusaffen führten sie zu chronischem Durchfall (HIGGINS et al., 1999). *Arcobacter* spp. wurden bei Lämmern mit Diarrhö (VANDAMME et al., 1992a), *Arcobacter skirrowii* bei Enteritisfällen verschiedener Tierarten isoliert (NEWLL et al., 1996).

Darüber hinaus liegen einzelne Nachweise vor von Kühen, die an *Arcobacter* spp. bedingter Mastitis litten (LOGAN et al., 1982) sowie von Magenulzera beim Schwein, aus denen diese Keime isoliert werden konnten (SUAREZ et al., 1997).

Bei der Beprobung von Lebensmitteln tierischer Herkunft erwies sich am häufigsten Geflügelfleisch als *Arcobacter*-positiv. Daher ist die Untersuchung von Geflügelherden von besonderem Interesse.

HO et al. (2008a) entnahmen bei zwei Hühner-Elterntierherden Proben des Intestinaltrakts, der Mukosa des Oviduct magnum und der Ovar Follikel von geschlachteten Tieren. Aus dem Darm wurden *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* mit einer Prävalenz von 85 % bzw. 20 % nachgewiesen, wobei sich die Ursache für das deutlich unterschiedliche Auftreten nicht abklären ließ. Aus dem Oviduct waren 15 % der Mukosa Proben der Herde A positiv für *A. butzleri*. Kein Nachweis gelang aus den Oviduct Proben der Herde B, aus den Ovarfollikeln der Tiere beider Herden sowie gelegten und ungelegten Eiern. Die Hennen konnten somit teilweise *Arcobacter* spp. im Intestinaltrakt und Oviduct beherbergen, ohne dass ein Übergang auf die Eier erfolgte.

Die vertikale Übertragung für andere Mitglieder der *Campylobacteriaceae* zwischen Elterntierherden und den Bruteiern bzw. Küken wird aufgrund der unterschiedlichen Datenlage verschiedener Studien kontrovers diskutiert. Einige Forschergruppen konnten *Campylobacter* spp. in Follikeln und Oviduct wie auch in den Brütereien und deren Abfällen nachweisen, was für eine vertikale Übertragung spricht. Andere statuieren, dass dieser Übertragungsweg im Vergleich zu der Kontamination über die Umgebung zu vernachlässigen ist (HO et al., 2008b). Auch die Studie von HOUF et al. (2002b) resümiert, dass die Kontaminationswege noch nicht abschließend geklärt sind. Acht Schlachthöfe in Belgien wurden untersucht, wobei die Prävalenz von *Arcobacter* spp. höher lag, als die der thermophilen *Campylobacter* spp. Es wurden bereits vor Schlachtbeginn *Arcobacter butzleri* und *A. cryaerophilus* auf dem Schlachthaus Equipment nachgewiesen, was für eine unzureichende Dekontamination spricht. Aus den Transportkisten wurde sowohl vor als auch nach der Reinigung *A. cryaerophilus* isoliert. Nach der Schlachtung, aber noch vor der Evisceration, fanden sich hunderte bis tausende *Arcobacter* pro Gramm auf der Halshaut der Broiler Schlachtkörper, hingegen fielen die je 30 untersuchten Proben pro Herde aus dem Intestinaltrakt negativ aus. Eine Studie von KELLER et al. (2006) in der Schweiz ergab das gleiche Phänomen. Die ausgesprochen hohe Kontaminationsrate auf der Halshaut ist somit weder durch die alleinige Übertragung von der Schlachthofausrüstung noch durch eine fäkale Route zu erklären (HOUF et al., 2002b).

Auch KJELDGAARD et al. (2009) gingen dem Phänomen nach, dass *Arcobacter* spp. nur in geringen Maße aus dem Intestinaltrakt von Geflügel isoliert werden kann, aber sich nach der Schlachtung auf der Oberfläche der Geflügelkarkassen in hohem Maße nachweisen lässt. Um

die Schlachthofgegebenheiten realitätsnah wieder zu spiegeln, verwendeten sie ein Hühnchenfleischsaftmedium. Die Bebrütung erfolgte bei 15°C, eine bekannter Maßen noch tolerierte Wachstumstemperatur, während sich bei 10°C immerhin noch ein minimales Wachstum zeigte und auch bei 5°C die Überlebensrate von *Arcobacter butzleri* größer als in BHI Bouillon ausfiel. Weiterhin wurde die Fähigkeit zur Biofilmbildung zwischen 5°C und 37°C nachgewiesen. Mit den Fähigkeiten, unter Kühlbedingungen zu überleben, sich zu vermehren und einen Biofilm zu bilden, ist *Arcobacter butzleri* in der Lage, sich im Schlachthof und in der Lebensmittelverarbeitung zu etablieren.

In den Infektionsversuchen an einwöchigen Hühnerküken von EIFERT et al. (2003) ergab sich eine Wiederfindung nur bei hohen Infektionsdosen und dann v. a. aus der Umgebung. Die Küken erhielten einen *A. butzleri* Cocktail mit einer Konzentration von 10^3 , 10^6 und 10^9 KbE/g. Im Alter von 3, 5 und 7 Wochen wurden Kotproben, Kloakentupfer und Tupferproben untersucht nach Kultivierung in der JOHNSON-MURANO Anreicherung und anschließender PCR. Es gab bei keiner Versuchsmodifikation eine 100 %ige Wiederfindung, bei den Konzentrationen von 10^6 oder 10^9 KbE/g ließen sich mindestens 80 % positive Umgebungstupfer und Fäkalproben ausmachen, die Kloakentupfer erwiesen sich jedoch nur zu 22 % und auch nur bei den mit 10^9 KbE/g infizierten Hühnerküken als positiv. Überhaupt kein positives Ergebnis wurde aus den Intestinalproben (Jejunum, Cäcum, Ileum und Colorectum) der Vergleichsgruppe erzielt, die ebenfalls mit 10^9 KbE/g *Arcobacter butzleri* infiziert wurde. Die Autoren folgerten daraus, dass *Arcobacter butzleri* nach der Inokulation die Küken nicht kolonisierte, aber den Verdauungstrakt passierte und dann die Umgebung, insbesondere die Einstreu, kontaminieren konnte. Infolge dessen scheint über die Einstreu eine entsprechende Verbreitung über das Federkleid und die Haut der Vögel möglich zu sein.

Verschiedene Studien unterstützen die hier zitierten Ergebnisse. ATABAY und CORRY (1997) konnten aus dem Gastro-Intestinaltrakt *Arcobacter*-positiver Hähnchenschlachtskörper nur eine positive Probe detektieren. WESLEY und BAETZ (1999) beproben via Kloaken-Tupfer achtwöchige Hähnchen, die zu 1 % positiv für *Arcobacter* spp., jedoch zu 32 % *Campylobacter*-positiv waren. 2006 untersuchten ATABAY et al. verschiedene Geflügelherden in Dänemark und ermittelten dabei, dass die Prävalenz von *Arcobacter* unter den lebenden Tieren bei Enten (73 % der untersuchten 15 Entenherden) und Puten (11 % der 37 Putenherden) deutlich höher lag als bei Hähnchen (4,3 % der 70 Herden).

Da Hunde und Katzen, die in Gemeinschaft mit dem Menschen leben, als potentiell Risiko für Humanerkrankungen durch *Campylobacter* und *Helicobacter* bekannt geworden sind, führten HOUF et al. (2009) in Belgien Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens von *Arcobacter* spp. bei diesen Haustieren durch. Dabei ließen sich in den Tupfern der beprobten Katzen keine *Arcobacter*-Nachweise führen, eine geringe Anzahl der beprobten Hunde jedoch erwies sich als Träger von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*.

Die Studien von FERA et al. (2009) in Süditalien hingegen, in denen ausschließlich Hauskatzen beprobt wurden, erbrachten bei 78,8 % der untersuchten Tiere *Arcobacter*-positive Ergebnisse, wobei *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* die dominierenden Spezies präsentierten, *A. skirowii* konnte nicht nachgewiesen werden. Somit bildet, neben der Aufnahme durch Lebensmittel und Wasser, der Kontakt zu Hund und Katze eine weitere mögliche Übertragungsrouten von *Arcobacter* spp.

Bei Nagern sind natürliche Infektionen bisher nicht bekannt geworden. Nach experimenteller Applikation von *Arcobacter* spp. an Mäuse, Meerschweinchen, Hamster und Kaninchen wurden keine klinischen Symptome oder pathologischen Veränderungen gefunden. Hingegen ging in der Studie von ADESIJI (2010) die Infektion bei allen experimentell infizierten Ratten an, sie verlief dosisabhängig. Es zeigten sich diarrhöischen Erkrankungen und Erregerausscheidung über den Kot nach bis zu 5 Wochen post infectionem. Somit könnten Ratten ein Reservoir und eine potentielle Übertragungsquelle für *Arcobacter* Infektionen bei Mensch und Tier bilden.

Einem bislang nicht publizierten Bereich widmeten sich AYDIN et al. (2009). In der Türkei wurde aus einer auf natürlichem Wege infizierten Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) *A. cryaerophilus* isoliert und dessen Pathogenität geprüft, indem die Stämme gesunden, einjährigen Regenbogenforellen in Kaltwasserhaltung (5°C) intramuskulär injiziert wurden. Nach experimenteller Infektion traten deutliche klinische Veränderungen auf wie Verlust der Schuppen, Exophthalmus, Ödeme an Flossen und Injektionsstelle, Nierennekrosen, Hämorrhagien am Herzen und vieles mehr, einschließlich veränderter Serumwerte. Die Untersuchungen unter Laborbedingungen zeigten, dass *A. cryaerophilus* für Regenbogenforellen virulent sein kann. Die Verwendung dieser Daten für das Biomonitoring von Forellenfarmen erfordert jedoch weitere Studien und eine sorgfältige Überprüfung der Umweltbedingungen (AYDIN et al., 2009).

2.3.2 Vorkommen beim Menschen

A. butzleri ist die am häufigsten vorkommende Spezies und kann auch beim Menschen Erkrankungen wie Enteritiden und Septikämien verursachen. Die Symptome, die durch *Arcobacter*-Bakterien ausgelöst werden, sind Erbrechen, Durchfall, Magenkrämpfe und Fieber. Sie ähneln denen einer Erkrankung durch Salmonellen oder *Campylobacter* (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2007).

Der erste Ausbruch, verbunden mit Enteritis und Abdominalkrämpfen, aufgrund von *Arcobacter*-Bakterien wurde 1983 an einer Grundschule in Italien diagnostiziert. Die Kinder litten unter starken Krämpfen im Bauchraum sowie vereinzelt unter Erbrechen und Fieber, jedoch nicht unter Durchfall. Aus allen Stuhlproben wurden *Arcobacter*-Bakterien isoliert, die ein identisches Protein Profil aufwiesen und zur Serogruppe 1 gehörten. Die Serotypisierung erfolgte anhand des LIOR-Serotypisierungsschema auf der Basis der Objektträger Agglutination von Antiserum aus *Arcobacter* Referenzstämmen und hitzelabilen Antigenen der Ausbruchsstämme (LIOR und WOODWARD, 1993; VANDAMME et al., 1992b). Bei Humanerkrankungen ist die Serogruppe 1 vorherrschend (LERNER et al., 1994; MANSFIELD und FORSYTHE, 2000). Auch in Thailand wurde eine Erkrankungshäufung, die überwiegend Kinder betraf, aufgrund von *Arcobacter* spp. dokumentiert. In diesen Fällen überwog die Durchfallssymptomatik. *Arcobacter* wurde bei 93 der 631 erkrankten Kinder nachgewiesen (TAYLOR et al., 1991).

In Deutschland wurden 1994 zwei Patienten aufgrund von massiven Krämpfen und persistierender Diarrhoe stationär aufgenommen. Sie waren durch chronische Erkrankungen vorbelastet (Diabetes mellitus Typ I, Hyperurämie, Alkoholmissbrauch) und für beide ergaben die Stuhluntersuchungen als einzigen Pathogenen *Arcobacter butzleri*. In diesen Fällen wurden die klinischen Symptome antibiotisch erfolgreich therapiert, nach der Behandlung wurde der Erreger nicht mehr im Stuhl der Patienten nachgewiesen. Die Autoren schrieben *Arcobacter butzleri* eine wesentliche ursächliche Rolle für die beobachteten klinischen Symptome zu (LERNER et al., 1994).

VANDENBERG et al. (2004) untersuchten über einen Zeitraum von 8 Jahren alle Stuhlproben zweier belgischer Krankenhäuser. Dabei wurde nach *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. fetus* *Arcobacter* spp. als vierthäufigster „*Campylobacter*-like organism“ identifiziert. Ähnliche Stuserhebungen in Frankreich kamen zu dem gleichen Ergebnis (PROUZET-MAULEÓN et al., 2006).

Von der ersten Humanerkrankung durch *A. cryaerophilus* berichteten TEE et al. (1988); es handelte sich um eine männliche Person mit Diarrhoe und Abdominalkrämpfen. Auch bei einem Patienten mit Urämie wurde *A. cryaerophilus* als Ursache der Infektion nachgewiesen (HSUEH et al., 1997).

2004 erfolgte die erste Isolierung von *A. skirrowii* bei einem 73-jährigen Mann, der an wochenlang anhaltenden Durchfall litt. Es konnte keine Assoziation mit Nutz- oder Haustieren ausgemacht werden, auch die Lebensmittelanamnese erschien nicht relevant für die Infektion zu sein und somit blieb die Quelle der Infektion ungeklärt. Nach 10 Tagen Krankenhausaufenthalt war ein deutlicher Rückgang der Symptome zu verzeichnen, ohne dass eine spezifische Behandlung durchgeführt wurde. Die Autoren beurteilten diese Spezies zwar als humanpathogen, jedoch von untergeordneter Bedeutung (WYBO et al., 2004).

A. butzleri wurde ebenfalls bei Patienten mit schwerem Durchfall (LEHNER et al., 2005, MARINESCU et al., 1996) detektiert, Studien zur mikrobiologischen Ätiologie der Reisediarrhö in Mexiko, Guatemala und Indien ermittelten bei 8 % der Fälle diesen Keim als ursächliches Agens (JIANG et al., 2010).

Neben Enteritiden ist *A. butzleri* in einigen Fällen von Bakteriämien aus dem Blut nachgewiesen worden, so z. B. bei einem Neugeborenen (ON et al., 1995) und bei einem Patienten mit Leberzirrhose (YAN et al., 2000). Bei einer Frau in Hong Kong, die an einer gangränösen Appendicitis mit Bakteriämie litt, konnte - neben *Escherichia coli* und *Streptokokkus milleri* - auch *Arcobacter butzleri* aus der Blutprobe isoliert werden (LAU et al., 2002). In Korea erfolgte die erste Detektion dieser Art bei einem Patienten mit alkoholbedingter Zirrhose (SHIN et al., 2005).

FERA et al. (2010b) wiesen in einer Studie in Italien nach, dass ältere Patienten mit einer Typ 2 Diabetes-Erkrankung häufiger von *Arcobacter* kolonialisiert waren, als die vergleichsweise Untersuchten ohne Diabetes Erkrankung.

Die klinische Signifikanz und das potentielle Gesundheitsrisiko durch diese „emerging pathogens“ erfordert weiterführende Untersuchungen, wie das Bundesinstitut für Risikobewertung 2007 konstatierte.

2.3.3 Vorkommen im Wasser

Über das natürliche Habitat sowie die Kontaminationsquelle für Lebensmittel mit *Arcobacter spp.* kann bisher nur spekuliert werden. Dieser Mangel an Kenntnissen liegt zum Teil an unzureichenden Nachweismethoden für *Arcobacter spp.* Neben einer möglichen Übertragung

durch kontaminiertes rohes Fleisch wurde *A. butzleri* nicht nur in Wasser, sondern auch auf Oberflächen von Wasserleitungssystemen (ASSANTA et al., 2002; GONZALES et al., 2007) sowie *A. cryaerophilus* auf Oberflächen von Geflügelschlachteinrichtungen isoliert (HOUF et al., 2003).

A. butzleri wurde in Flüssen, Abwasser sowie im Meer nachgewiesen (COLLADO et al., 2010b; MORENO et al., 2003; MUSMANNO et al., 1997; STAMPI et al., 1993). Es liegen verschiedene Untersuchungen von Wasserproben aus China im Umfeld der Erdölgewinnung vor, bei denen jeweils positive *Arcobacter*-Befunde vorkamen (HAN et al., 2009; LIU et al., 2009). Umweltverschmutzung wie auch die Intensivhaltung der Fischfarmen beeinflussen die sensible Symbiose von Korallen mit den dazugehörigen Algen und Mikroben. In einer Studie wurden Teile von Korallenriffen in unterschiedlicher Intensität den Einflüssen von Umweltverschmutzung und Fischfarming ausgesetzt. Es stellte sich in kurzer Zeit eine deutliche Veränderung der Korallenflora ein, in der Pathogene wie z. B. *Arcobacter* spp. zunahmen, ohne dass äußerliche Veränderungen der Küste wahrnehmbar waren (GARREN, 2009).

Positive Aspekte bzgl. des Vorkommens von *Arcobacter* spp. sind allerdings auch zu berücksichtigen. So verursacht die Emission von Schwefelwasserstoff aus Abwasserkanälen über die Bildung von Schwefelsäure massive Korrosion. Eine Möglichkeit zur Prävention wurde in der Studie von DE GUSSEME et al. (2009) versucht. Dabei wurde ein Konsortium aus Nitrat-reduzierenden, Sulfid-oxidierenden Bakterien in einen kontinuierlichen Rührtankreaktor (Batch Reaktor) angereichert, um eine Methode zu entwickeln, mit der die gelösten Sulfide beseitigt werden können. Der Bakterien-Mix, überwiegend bestehend aus *Arcobacter* spp., zeigte sich in der Lage, 99% des Sulfids zu entfernen.

Die Übertragung der *A. butzleri* kann über kontaminiertes Trinkwasser (FESTY et al., 1993; RICE et al., 1999) erfolgen, auch in Deutschland war der Nachweis in Trinkwasserspeichern möglich (JACOB et al., 1993). ERTAS et al. (2010) isolierten erstmalig *A. butzleri* und *A. skirrowii* gemeinsam aus Trinkwasser und aus der Milch klinisch gesunder Kühe in der Türkei. Sie statuierten, dass die Präsenz von *Arcobacter* spp. in Rohmilch und Wasser eine potentielle Gefahrenquelle für die menschliche Gesundheit bilden können.

Demgegenüber steht die Studie von COLLADO et al. (2010a). Sie untersuchten, in welchem Maße *Arcobacter* im Zuge der Wasseraufbereitung eliminiert wird. In Spanien im Einzugsgebiet des Llobregat Flusses wurde an 3 Trinkwasseraufbereitungsanlagen eine hohe Kontamination des Zulaufwassers festgestellt. Die dominierende Spezies bildete *A. butzleri*,

weiterhin wurde *A. cryaerophilus* und in wenigen Proben *A. skirrowii* isoliert. Auch in diesen Untersuchungen zeigte sich eine große genotypische Diversität. Aus dem gewonnenen Trinkwasser ließen sich keine Nachweise führen, weshalb sich die Schlussfolgerung ergab, dass die Trinkwasseraufbereitung *Arcobacter* effektiv beseitigt.

2.3.4 Umweltassoziierte *Arcobacter* spp.

Auf den nordwestlichen Hawaii-Inseln wurde in einer sehr salzreichen Lagune eine bisher noch nicht beschriebene *Arcobacter* spp. entdeckt, später *Arcobacter halophilus* (Griechisch: halos = Salz, philos = Freund) genannt. Hierbei handelt es sich um die erste bislang gefundene *Arcobacter* Art, die obligat halophil ist (DONACHIE et al., 2005). Sie weist eine enge Verwandtschaft zu dem stickstoffbindenden Bakterium *Arcobacter nitrofigilis* auf, welches in den Wurzeln von *Spartina alterniflora*, einer in der Salzmarsch wachsenden Pflanze nachgewiesen wurde (McCLUNG et al., 1983). Zunächst als *Campylobacter nitrofigilis* bezeichnet, wurde mit der Revision der Taxonomie (VANDAMME et al., 1991) der Name *A. nitrofigilis* eingeführt. Nach bisherigen Erkenntnissen besitzen diese beiden Vertreter in Hinsicht auf menschliche oder tierische Erkrankungen keine Bedeutung (DONACHIE et al., 2005).

2.4 Nachweis in Lebensmitteln

2.4.1 Rind- und Schweinefleisch

In der Literatur werden zunehmend *Arcobacter*-Isolierungen aus rohen Lebensmitteln tierischer Herkunft (v. a. Geflügelfleisch, aber auch Rohfleischerzeugnisse vom Rind, Schaf und Schwein) mit - möglicherweise methodisch bedingt - unterschiedlichen Nachweisraten beschrieben (MAC et al., 2006 a, b; PETERS et al., 2006; RIVAS et al., 2004).

In den Niederlanden wurde in 1,5 % der untersuchten Rinderhackfleischproben (n=68) *Arcobacter* spp. ermittelt (DE BOER et al., 1996). Ihr Vorkommen bei Schlachtschweinen sowie die Anfälligkeit der Ferkel auf Infektionen weisen auf eine mögliche Assoziation der *Arcobacter* spp. mit Schweinefleischerzeugnissen hin. COLLINS et al. (1996a) fanden *Arcobacter* in 54 % der Schweinehackfleischproben (n=289) aus fünf Schlachthöfen. Die Häufigkeiten variierten zwischen 0 % und 89 %. Es wurde nicht geklärt, ob die Verarbeitungspraxis in den Quellenbetrieben oder eher die Hygienebedingungen auf dem Schlachthof die Prävalenz der *Arcobacter* spp. bei Schweinehackfleisch beeinflusst. Bei

Verwendung eines *Arcobacter* Selektivmediums, isolierten DE BOER et al. (1996) *Arcobacter* jedoch in nur 0,5 % (n=1 von 194) der Schweinefleischproben, die in den Niederlanden aufgekauft wurden. Diese Diskrepanz könnte durch die Problematik der Differenzierung zwischen *Arcobacter* und *Campylobacter* zurückzuführen sein, ggf. auch durch den Unterschied zwischen dem Schweinehackfleisch und den minimal bearbeiteten Schweinefleischaufschnitten (pork cuts). Insbesondere jedoch könnten die Isolierungsmethoden diese Unterschiede erklären.

DE SMET et al. (2010a) führten Untersuchungen an Rinderschlachtkörpern nach der Evisceration und nach 24 Stunden Kühlung durch. Nach der Evisceration ermittelten sie zu 37 % *Arcobacter*-positive Ergebnisse, nach der Kühlung zeigte sich die Rate mit 7 % deutlich reduziert. Weiterhin wurden Rinderhackfleischproben aus dem Einzelhandel untersucht, deren Kontaminationsrate 9 % betrug. *Arcobacter butzleri* bildete jeweils die dominierende Spezies. Als Resumé zogen sie aus ihrer Studie, dass eine gute Hygiene Praxis äußerst bedeutsam ist, um in der Lebensmittelkette ein hohes Sicherheitsniveau für den Verbraucher zu gewährleisten.

2.4.2 Geflügelfleisch

Ebenso wie *Campylobacter* wurde *Arcobacter* häufiger aus Geflügelfleisch als aus rotem Fleisch isoliert (siehe Tabelle 2). Das Geflügel kann somit als ein wichtiges Reservoir für *A. butzleri* angesehen werden. So wurden von ATANASSOVA et al. (2008) Proben aus der Geflügelschlachtung auf das Vorkommen von *Arcobacter* untersucht. Das Material stammte aus 5 Masthähnchen- und 5 Putenherden während der Schlachtung und Herrichtung. Die Hähnchenschlachtkörper zeigten sich zu 43,0 %, die Putenkarkassen zu 18,2 % kontaminiert, wobei bemerkenswert ist, dass sich die Prävalenz im Verlauf der Herrichtung veränderte. Bei den Hähnchen war ein Anstieg nach der Kühlung, bei den Puten ein Abfall im Verlauf der Bearbeitung zu verzeichnen. Im Rahmen der Studie wurden alle drei humanrelevanten Spezies identifiziert, *A. butzleri* etwas häufiger als *A. cryaerophilus* und *A. skirowii* (ATANASSOVA et al., 2008).

In Frankreich wurde *A. butzleri* in 81 % der untersuchten Geflügelfleischproben (n=201) nachgewiesen (MARINESCU et al., 1996). Nahezu die Hälfte der Geflügelfleisch-Isolate in dieser Studie gehörte zur Serogruppe 1. Serogruppe 1 und 5 sind primär mit menschlichen Infektionen assoziiert (FESTY et al., 1993; LIOR und WOODWARD, 1993).

In einer Stichprobenerhebung über Geflügelfleischerzeugnisse in Kanada, wurde *A. butzleri* in 97 % der Geflügelfleischproben (121 von 125) aus fünf verschiedenen Schlachteinrichtungen

nachgewiesen. Zusätzlich wurde *A. butzleri* bei ganzen Hähnchen und Hähnchenhackfleisch sowie in Putenfleischproben gefunden, die im Einzelhandel erhältlich waren (MANKE, 1997). Ähnlich wie in der Studie aus Frankreich, dominierte auch in kanadischem Geflügel der Serotyp 1 (LIOR und WOODWARD, 1993).

MANKE et al. (1998) bestimmten die Prävalenz der *Arcobacter* in mechanisch zerlegten Putenfleischproben aus drei Fleischverarbeitungseinrichtungen in den USA. Von 395 untersuchten Proben waren 77 % *Arcobacter*-positiv. *A. butzleri* wurde dabei in 56 % der Proben detektiert.

Im Gegensatz zu Häufigkeiten der Geflügelfleischkontaminationen in Frankreich, Kanada und USA wurde *Arcobacter* in nur 24 % der im Einzelhandel erworbenen Geflügelfleischproben (53 von 224) in den Niederlanden beobachtet (DE BOER et al., 1996). Die unterschiedlichen Nachweishäufigkeiten könnten auf die unterschiedlichen hygienischen Bedingungen in den Schlachteinrichtungen sowie auf Differenzen in der Sensitivität der jeweiligen Isolierungsmethode zurückgeführt werden.

RIDSDALE et al. (1998) nahmen Enten in das Untersuchungsprogramm auf. Es wurden 10 Entenkarkassen aus zwei verschiedenen Herden und je zwei gepoolte Proben aus Zäkuminhalt von Enten aus vier Herden auf *Campylobacter* und *Arcobacter* spp. untersucht. Dabei wurde insgesamt eine überraschend große Speziesvielfalt aus der verhältnismäßig geringen Probenanzahl etabliert. Aus den Zäkum Proben wurden *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter cryaerophilus* und *A. butzleri*, aus den Karkassen *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* und *A. skirrowii* angezüchtet. Weil die *Arcobacter* Isolate kein Wachstum bei 42°C, also annähernd der Körpertemperatur des Geflügels, zeigten, gehen die Autoren davon aus, dass *Arcobacter* lediglich vorübergehend im Zäkum der Enten verweilen und nicht zur ständigen Darmflora gehören.

Aufgrund der zahlreichen Funde von *Arcobacter* spp. auf Geflügel-, insbesondere Hühnerschlachtkörpern, die PEJCHALOVÁ et al. (2008) in ihren Studien in Tschechien ebenfalls fanden, statuierten die Autoren, dass der Kreuzkontamination beim Handling von Hühnerkarkassen eine Schlüsselrolle bei der Verbreitung von *Arcobacter* spp. zukommen könnte.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht zur Prävalenz von *Arcobacter* spp. bei rohem Fleisch aus dem Einzelhandel in ausgewählten Studien.

2.4.3 Vergleichende Untersuchungen

Gemäß der Literatur lagen die Kontaminationsraten bei Hähnchenfleisch zwischen 0 % (ZANETTI et al., 1996) und 100 % in Thailand, in Japan lag die Quote bei 48 % (MORITA et al., 2004). In den Studien von PETERS et al. (2006) und MAC et al. (2006a, b) wurde die Kontaminationsrate frischer Hähnchen- und Schweinefleischproben aus dem Einzelhandel mit *Arcobacter* spp. nach der Methode von HOUF et al. (2001b) untersucht. Die Studie umfasste 14 Hähnchen und 67 Schweinefleischproben. Der Anteil an mit *Arcobacter* spp. kontaminierten Proben betrug 10 % bei Schweine- und 79 % bei Hähnchenfleisch. Diese Ergebnisse bestätigen Studien in anderen Ländern, in denen gezeigt wurde, dass Hähnchen häufiger mit *Arcobacter* spp. kontaminiert war als Schweinefleisch.

Untersuchungen in jüngerer Zeit an Fleisch aus dem Einzelhandel in Korea erbrachten eine Prävalenz von 18,9 % *A. butzleri* und 3,3 % *A. cryaerophilus* in Hühnchenfleischproben, keinen Nachweis erbrachten dahingegen das beprobte Schweine- und Rindfleisch (LEE et al., 2010).

BARTHOLOMÄ und NAUMANN (2007) führten eine qualitative und quantitative Untersuchung zum Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* in Hähnchenfleisch und Hackfleisch aus Rind und Schwein in Anlehnung an HOUF et al. (2001) durch. Da die enge Verwandtschaft mit *Campylobacter* spp. eine biochemische Differenzierung ausschließt, war dem kulturellen Nachweis eine molekularbiologische Identifizierung mittels Multiplex-PCR nachgeschaltet.

Im Rahmen der Stuserhebung wurden 82 Proben rohe Geflügelteilstücke mit Haut (Hähnchen: 80, Pute: 1, Gans: 1) und 54 Hackfleischproben (gemischtes Hackfleisch: 34, Schweinehackfleisch: 13, Rinderhackfleisch: 7) auf *Arcobacter* spp. untersucht. Die detaillierten Befunde zeigt Tabelle 2.

Die quantitativen Untersuchungen (Nachweisgrenze: 10 KbE/g) ergaben deutliche Hinweise auf *Arcobacter* spp. In keiner der Proben wurde *A. skirrowii* nachgewiesen. Die erhobenen Daten belegen eine hohe Kontaminationsrate von rohen Geflügelteilstücken mit *A. butzleri*, gefolgt von *A. cryoerophilus*. In den Hackfleischproben vom Rind und Schwein wurde *A. butzleri* als ausschließlich vorhandene Spezies nachgewiesen (Tabelle 3).

Tabelle 2: Nachweisraten von *Arcobacter* spp. in rohen Geflügelteilstücken mit Haut (n=82) und Hackfleisch (n=54) (Nachweisgrenze: 10 Kbe/g) (aus BARTHOLOMÄ und NAUMANN, 2006)

	GEFLÜGELTEILSTÜCKE	HACKFLEISCH
	Nachgewiesen in 10 g (n/%)	Nachgewiesen in 10 g (n/%)
<i>Arcobacter</i> (A.) spp.	70/85,4	9/16,7
<i>A. butzleri</i>	33/40,2	9/16,7
<i>A. cryaerophilus</i>	3/3,7	0/0
<i>A. butzleri</i> und <i>A. cryaerophilus</i>	34/41,5	0/0
<i>A. skirrowii</i>	0/0	0/0

In der Studie von RIVAS et al. (2004) wurden insgesamt 88 Hühner-, Schweine-, Rind- und Lammfleischproben von verschiedenen Hersteller bezogen, in *Arcobacter* broth (AB) mit Cefoperazon-Amphotericin-Teicoplanin-(CAT)-Supplement angereichert und mittels PCR auf *Arcobacter* spp. untersucht. PCR-positive Anreicherungen wurden auf Blutagar ausgestrichen und aerob bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. *Arcobacter* wurden in 35 % der Proben als *Arcobacter butzleri* nachgewiesen. Am häufigsten wurde dieses Bakterium aus Geflügelfleisch (73 %), gefolgt von Schweinefleisch (29 %), Rind- (22 %) und Lammfleisch (15 %) isoliert.

Durch das Vorkommen von *Arcobacter*-kontaminiertem Schweine- und Hähnchenfleisch ist eine Aufnahme von *Arcobacter* spp. durch den Menschen bei Rohverzehr oder Verzehr von unzureichend erhitztem Fleisch bzw. bei mangelnder Küchenhygiene durch die Kontamination anderer, verzehrfertiger Lebensmittel möglich.

Tabelle 3: Übersicht zur Verbreitung von *Arcobacter* spp. bei rohem Fleisch aus dem Einzelhandel

PROBENART	LAND	PRO- BENAN- ZAHL	ARCOBACTER (%)	LITERATUR
Rindfleisch	Niederlande	68	1,5	DE BOER et al. 1996
Schweinefleisch	Niederlande	194	0,5	DE BOER et al. 1996
Schweinefleisch	Italien	27	3,7	ZANETTI et al. 1996
Schweinefleisch	USA	200	26	OHLENDORF und MURANO 2002
Schweinefleisch	Mexico	45	52	VILLARRUEZ-LOPEZ et al. 2003
Schweinefleisch	Australien	21	29	RIVAS et al. 2004
Schweinefleisch	Japan	100	7	KABEYA et al. 2004
Schweinefleisch	Deutschland	67	10	MAC et al. 2006a, b
Schweinefleisch	Deutschland	93	48,4	TESCHKE 2008
Hähnchenfleisch	Niederlande	220	24	DE BOER et al. 1996
Hähnchenfleisch	Italien	32	0	ZANETTI et al. 1996
Hähnchenfleisch	USA	50	84	JOHNSON und MURANO 1999a,b
Hähnchenfleisch	USA	100	19	WESLEY und BAETZ 1999
Hähnchenfleisch	Spanien	96	53	GONZALES et al 2000
Hähnchenfleisch	Belgien	30	100	HOUF et al. 2000
Hähnchenfleisch	Belgien	157	84	HOUF et al. 2001
Hähnchenfleisch	Türkei	44	95	ATABAY et al. 2003
Hähnchenfleisch	Mexico	45	40	VILLARRUEZ-LOPEZ et al. 2003
Hähnchenfleisch	Japan	100	23	KABEYA et al. 2004
Hähnchenfleisch	Thailand	10	100	MORITA et al. 2004
Hähnchenfleisch	Japan	41	48	MORITA et al. 2004
Hähnchenfleisch	Australien	22	73	RIVAS et al. 2004
Hähnchenfleisch	Deutschland	82	85	BARTHOLOMÄ und NAUMANN 2006
Hähnchenfleisch	Deutschland	14	79	MAC et al. 2006a,b
Geflügelfleisch	Niederlande	224	24	DE BOER et al. 1996
Geflügelfleisch	Kanada	125	97	LAMMERDING et al. 1996
Geflügelfleisch	Frankreich	201	81	MARINESCU et al. 1996
Geflügelfleisch	Großbritannien	15	100	ATABAY et al. 1996
Geflügelfleisch	USA	395	77	MANKE et al. 1998
Geflügelfleisch	Deutschland	151	80,1	TESCHKE 2008

2.4.4 Weitere Lebensmittel

Arcobacter spp. sind zwar hinreichend als „emerging foodborne“ und „waterborn enteropathogens“ bekannt, über ihr Vorkommen in Lebensmittel gibt es jedoch nur partielle Kenntnisse, denn die meisten bisher durchgeführten Studien konzentrierten sich auf Geflügel, Schwein und Rind und weiterhin ermöglichen die angewandten Methoden nicht die Identifikation aller bisher bekannten Spezies. COLLADO et al. (2009b) wählten 203 Untersuchungsmaterialien in Spanien aus, die sich zusammensetzten aus 119 Proben von 7 verschiedenen Fleischarten und 84 Proben von 4 Arten Schalentieren. Auf alle Zielmaterialien bezogen lag die Prävalenz bei 32 %, am höchsten kontaminiert zeigten sich Muscheln (5 von 5 Proben, 100 %) und Huhn (9 von 14 Proben, 64,3 %), gefolgt von Schwein (9 von 17 Proben, 53,0 %), Miesmuscheln (23 von 56 Proben, 41,1 %) und Entenfleisch (2 von 5 Proben, 40,0 %). Puten- und Rindfleisch erbrachten annähernd die gleiche Befallsrate (10 von 30 Proben, 33,3 %; 5 von 16 Proben, 31,3 %). Kaninchenfleisch erwies sich als am geringsten kontaminiert (1 von 10 Proben, 10,0 %). Keine Nachweise konnten in Austern, gefrorenen Shrimps und Würsten geführt werden. Diese Erhebung war die erste, in der 5 der 7 anerkannten *Arcobacter* spp. nachgewiesen wurden. *Arcobacter butzleri* war die vorherrschende Spezies (63,0 % der Isolate), gefolgt von *Arcobacter cryaerophilus* (26,6 %), *Arcobacter mytili* (4,7 %), *Arcobacter skirrowii* (3,1 %) und *Arcobacter nitrofigilis* (3,1 %). Drei der Isolate gehören zu potentiell neuen phylogenetischen Linien. Als außergewöhnlich muss das Isolieren von *A. nitrofigilis* aus Lebensmittelproben bezeichnet werden. Da diese Art jedoch assoziiert zu *Spartina alterniflora* vorkommt (siehe Kapitel 2.3.4), die in Brackwasser wächst und die in die Studie einbezogenen Miesmuscheln aus einem Brackwassereinzugsgebiet stammten, erscheint der Fund plausibel. Seit der Beschreibung durch MCCLUNG 1983 wurde *A. nitrofigilis* zuvor nur von einer Forschergruppe identifiziert (MAUGERI et al., 2000), wobei der Fund jedoch nicht klar einer Probenart (Muscheln oder Wasser) zuzuordnen war. Somit wurde in dieser Studie von COLLADO et al. (2009b) seit 1983 der erste gesicherte Nachweis in einem Lebensmittel geführt. Abschließend stellten die Autoren fest, dass *Arcobacter* in dem untersuchten Produktfeld weit verbreitet ist.

Von MAC et al. (2006a, b) wurde nachgewiesen, dass *A. butzleri* mindestens bis zum neunten Tag und *A. skirrowii* eine knappe Woche in Mettwurst überlebensfähig ist. In mit *A. cryaerophilus* kontaminierten Würsten, zu deren Herstellung mit *A. butzleri* kontaminiertes Fleisch verwendet worden war, setzte sich ab dem zweiten Tag *A. butzleri* gegenüber *A. cryaerophilus* durch. Weiterhin zeigte sich, dass Starterkulturen verschiedener Herkunft und

Zusammensetzung das Wachstum von *A. butzleri* in unterschiedlichem Umfang hemmen können.

Kürzlich betrachteten GONZALEZ et al. (2010) einen gänzlich neuen Aspekt aus dem Lebensmittelsortiment, indem sie frischen Salat mit verschiedenen Nachweisverfahren untersuchten. Dabei ergab die Real-Time PCR mit 20 % *Arcobacter*-positiv detektierter Proben die höchste Ausbeute. Als einzige Spezies wurde *Arcobacter butzleri* ermittelt, diese Isolate zeigten im RAPD-PCR Profil eine große genetische Diversität.

2.5 Isolierungsmethoden und Identifizierung von *Arcobacter* spp.

2.5.1 Kulturelle Nachweismethoden

Die morphologische Ähnlichkeit zwischen *Arcobacter* und *Campylobacter* kann die korrekte Identifizierung erschweren. Eine Schlüsseleigenschaft bei der Unterscheidung der *Arcobacter* spp. von *Campylobacter* spp. bildet die niedrige Temperatur (15°C bis 30°C), die zur initialen Isolierung verwendet wird (NEIL et al., 1985). Während *C. jejuni* und *C. coli* bei 42°C optimal wachsen, zeigen nur wenige *Arcobacter* diese Thermotoleranz.

Zur Isolierung der *Arcobacter* spp. gibt es keine Standardmethode, somit ist der Vergleich zwischen den Studien erschwert (OHLENDORF und MURANO, 2002b). Darüber hinaus ist kein Gold-Standard für eine sichere Detektion gegeben.

Der erste Nachweis von *Arcobacter* spp. aus abortierten Rinder- und Schweinefeten gelang unter Verwendung des *Leptospira* Mediums Ellinghausen, McCullough, Johnson und Harris-polysorbate 80 (EMJH-80 Medium), mit dem selektiven Agens 5-Fluoruracil, welches in verschiedenen später entwickelten Medien ebenfalls Verwendung fand (ELLIS et al., 1977). Seitdem wurden diverse Selektivmedien und Isolationsprotokolle angewendet, um *Arcobacter* aus verschiedenen Matrices anzuzüchten. Die meisten davon waren modifizierte *Campylobacter* Nährböden, die bei niedrigeren Temperaturen inkubiert wurden, oder sogar *Yersinia* Medien. Aber Studien, einschließlich Untersuchungen zur Empfindlichkeit gegenüber selektiven Agentien, zeigten auf, dass keines geeignet war, alle Tier-assoziierten *Arcobacter* spp. zu detektieren (HOUF et al., 2001a).

Das Forscherteam ATABAY et al. (1998a) arbeiteten mit CAT Anreicherung und Plattenmedium, deren selektive Agentien Cefoperazon, Amphotericin und Teicoplanin bilden. Dabei gelang die Isolierung von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*, für *A. skirrowii* war dieses

Medium nicht geeignet. Nach ihren Erfahrungen erbrachte das API Campy und Preston Identifizierungsschema für *Arcobacter* nur unzufriedenstellende Ergebnisse. HOOSAIN und LASTOVICA (2009) führten ähnliche Untersuchungen für Keime mit gleichartiger Koloniemorphologie durch, dabei erwies sich das Oxoid Biochemical Identification System (OBIS) Campy test (ID0800M) als geeignet, um im Diagnostiklabor eine Verdachtsdiagnose auf *Arcobacter*, *Campylobacter* und *Helicobacter* zu stellen

ATABAY und CORRY (1998a) verglichen das von Oxoid entwickelte *Arcobacter* Anreicherungsmedium (AM) mit den zwei *Campylobacter* Anreicherungsmedien Preston Bouillon (Oxoid) und Lab-M-BOLTON Bouillon. Die drei getesteten Spezies *A. butzleri*, *A. skirrowii* und *A. cryaerophilus* zeigten gutes Wachstum auf dem AM Medium, kein Wachstum hingegen ließ sich in der Preston Bouillon erkennen und in Lab-M trat Vermehrung sehr spärlich in Erscheinung. Inzwischen ist das *Arcobacter* Medium von Oxoid auch in Deutschland erhältlich.

Ebenfalls 1996 arbeiteten DE BOER et al. an einer Methode zur Detektion von *Arcobacter* Spezies aus Fleischprodukten des Einzelhandels. Sie verwendeten eine *Arcobacter* Selektivbouillon, bestehend aus *Brucella* Bouillon mit Pferdeblut und einen halbfesten *Arcobacter* Selektiv Nährboden aus Mueller-Hinton Medium mit Agarzusatz, denen als selektive Agentien Cefoperazon, Piperacillin, Trimethoprim und Cycloheximid zugesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 24°C. In einer Vielzahl von Produkten konnten *Arcobacter butzleri* sowie *Arcobacter*-ähnliche Stämme isoliert werden, die sich in einer großen Vielfalt von Sero- und Biotypen zeigten.

LAMMERDING et al. (1996) verwendeten CCDA (Preston's charcoal-cephalothin-desoxycholate agar), eigentlich zur Isolierung von *Campylobacter* spp. entwickelt, und einen modifizierten CCDA, in dem das Cephalothin durch Cefoperazon ersetzt wurde, erfolgreich zur Isolierung von *Arcobacter*.

JOHNSON und MURANO (1999a, b) orientierten sich an diesen Ergebnissen sowie an den Studien von VANDAMME et al. (1989), in denen ermittelt wurde, dass im Vergleich von Columbia Agar, Nähragar No 2, Mueller-Hinton und BHI, auf Blut-haltigen Medien ein gutes Wachstum von *Arcobacter* zu erreichen war. Verbesserte Wachstumsraten zeigten diese Bakterien bei Zusatz von Spezial Pepton, LAB Lemco Pulver, Hefeextrakt und NaCl. In der Bouillon wurde als detoxifizierendes Agens gegen Sauerstoffverbindungen statt Blut

Aktivkohle verwendet, da so eine bessere Haltbarkeit und geringe Gefahr der mikrobiellen Kontamination gewährleistet war. Strikt mikroaerobe Keime wie *Campylobacter* werden bei diesen Zusätzen deutlich weniger von der Sauerstoff Toxizität beeinträchtigt. Ebenfalls zur Verringerung von Sauerstoffverbindungen diente der Zusatz von Thioglycolat. Weiterhin wurden Mineralsalze als wachstumsfördernd befunden, wie z. B. von COLLINS et al. (1996a) in einem *Yersinia* Medium zur Isolierung von *Arcobacter* aus Schweinefleisch vorgeschlagen. In der Formulierung von JOHNSON und MURANO kamen Natrium- und Kaliumphosphat zum Einsatz. Natriumpyruvat dient als reduzierende Säure und als Kohlenstoffquelle für das Wachstum der Keime. Zur Unterdrückung der Begleitflora wurden Cefoperazon, in der Anreicherungsbouillon zusätzlich Gallensalze und 5-Fluorouracil-5 verwendet. Ziel der Arbeitsgruppe um JOHNSON und MURANO war es, ein selektives *Arcobacter* Medium zu entwickeln, das zu maximaler Ausbeute unter aerober Inkubation führt, um die aufwendigere mikroaerobe Bebrütung zu ersetzen. Die von ihnen entwickelten Medien lieferten im Vergleich mit ASB und ASM (DE BOER et al. 1996), EMJH-P80 und CVA-Agar (BHI-Agar mit Cefoperazon, Vancomycin, Amphotericin und Blutzusatz) die höchsten Nachweisraten (JOHNSON und MURANO 1999a, 1999b).

OHLENDORF und MURANO (2002a) führten vergleichende Untersuchungen mit vier kulturellen Untersuchungsprotokollen für die Isolierung von *Arcobacter* spp. aus Schweinefleisch durch. Zum Einsatz kamen die COLLINS Methode (COLLINS et al., 1996a) unter Verwendung von EMJH-P80 als Anreicherungsmedium und anschließendem Ausstrich auf CVA-Agar sowie die Direkte COLLINS Methode (MANKE et al., 1998; WESLEY und BAETZ, 1999), bei der nach Anreicherung in EMJH-P80 unmittelbar die Untersuchung via PCR durchgeführt wird und somit zwei Tage für den Nachweis eingespart werden. Des Weiteren kamen die oben beschriebenen Verfahren nach DE BOER (DE BOER et al. 1996) sowie JOHNSON und MURANO (JOHNSON und MURANO 1999a, 1999b) zum Einsatz. Als Bestätigung für verdächtige Kolonien wurden zunächst der Katalase und der Oxidase Test sowie die Gram-Färbung, im Anschluss die PCR nach HARMON und WESLEY (HARMON und WESLEY, 1996) verwendet. Die höheren Nachweisraten ergaben die Medien nach JOHNSON & MURANO und die Direkte COLLINS Methode, wobei partiell JOHNSON und MURANO eine größere Ausbeute erbrachte. Die Nährmedien nach COLLINS unterlagen der Direkten COLLINS Isolierung, da die Begleitflora nicht ausreichend unterdrückt wurde und die Platten überwuchern konnte. Eine weitere interessante Erkenntnis dieser Studie ist, dass aus Fleisch von älteren Tieren und Fleisch mit höherem Fettanteil weniger *Arcobacter* nachweisbar waren, als aus Fleisch von jüngeren Tieren bzw. mit niedrigem Fettgehalt (OHLENDORF et al. 2002a). In einer weiteren

Studie testeten die Autoren die Wiederfindungsrate nach Inokulation von Schweinefleisch mit *Arcobacter butzleri* und *A. cryaerophilus* unter Benutzung der oben genannten kulturellen Isolationsprotokolle. Am sensitivsten erwiesen sich die Medien nach JOHNSON & MURANO, wobei die Wiederfindungsrate von *A. butzleri* höher lag als für *A. cryaerophilus* (OHLENDORF et al., 2002b).

2001 untersuchten HOUF et al. (2001a) die Empfindlichkeit anhand von 101 *Arcobacter* Stämmen der Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*, isoliert aus repräsentativ verschiedenen Quellen, gegenüber den in den Nährböden verwendeten Antibiotika. Sie ermittelten, dass bei den üblicherweise in den Medien üblichen Konzentrationen 5-Fluoruracil, Novobiocin, Trimethoprim und Cefoperazon geeignet sind, um die Begleitflora zu hemmen. Dies allerdings wird bei den bislang verwendeten Untersuchungsprotokollen in keinem Fall ausreichend gewährleistet. Der empfindlichste Keim *A. skirrowii*, aber auch *A. cryaerophilus* können sich bei der Detektion z. T. des Nachweises entziehen, da die minimale Hemmkonzentration (MIC = Minimal Inhibitory Concentration) für Piperacillin nur geringgradig über der z. B. im DE BOER Medium eingestellten Konzentration liegt. Dies könnte erklären, warum hier *A. butzleri* als einzige Spezies nachgewiesen wurde. Gleiches gilt für den Einsatz von Cefoperazon mit einer Menge von 32 µg/ml, die u. a. im JOHNSON und MURANO Medium eingesetzt werden. Hingegen zeigten sich die Bakterien empfindlich gegenüber Rifampin, Cefotaxin und Colistin. Gemäß den Studien von ATABAY und AYDIN (2001) sowie FERA et al. (2003) verhalten sich *Arcobacter butzleri* und *A. cryaerophilus* sehr empfindlich gegenüber Fluorochinolonen (z. B. Enro- oder Marbofloxacin) und dem Aminoglycosid Amikain. Hohe Resistenzlevel zeigten sich bei den zwei Spezies u. a. gegen Penicilline und Trimethoprim, bezüglich der Einstufung von Chloramphenicol allerdings gelangten die Forschergruppen zu konträren Aussagen, was auf die unterschiedliche Resistenzlage der jeweils verwendeten Stämme hindeutet.

Aufbauend auf den Erkenntnissen ihrer Empfindlichkeitsstudie entwickelten HOUF et al. (2001b) ein Supplement bestehend aus Amphotericin B, Cefoperazon, 5-Fluoruracil, Novobiocin und Trimethoprim, dass der *Arcobacter* Broth von Oxoid mit Agarzusatz beigefügt wurde. Daraus entstand ein neues Isolationsprotokoll, das nach Inkubation für 48 Stunden bei 28°C unter microaeroben Bedingungen zu sehr hohen Nachweisraten mit optimaler Unterdrückung der Begleitflora bei dem untersuchten Geflügel führte.

Nachgewiesen wurden *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*, z. T. auch als Co-Kontamination. Darüber hinaus wurde das Untersuchungsprotokoll für *A. skirrowii* validiert. Eine weitere interessante Erkenntnis der Studie bestand darin, dass die untersuchten belgischen Geflügelproben eine höhere Kontamination an *Arcobacter* als an *Campylobacter* aufwiesen.

Es erscheint empfehlenswert, mehr als ein kulturelles Verfahren zur sicheren Detektion von *Arcobacter* zu verwenden. SCULLION et al. (2004) verglichen die Methoden von ON et al. (2002), CAT Bouillon mit anschließender Membranfiltrationstechnik, HOUF et al. (2001b) sowie JOHNSON und MURANO (1999a, b) und modifizierten die Methode nach JOHNSON und MURANO. Dabei nahm das Autorenteam um SCULLION nach 24 und nach 48 Stunden einen Ausstrich aus der Anreicherungsbouillon vor, was die Detektionsrate von 50 % auf 68 % erhöhte und damit zu genauso vielen Isolierungen führte wie sie mit den Medien nach HOUF erreicht wurden. Bemerkenswert hierbei ist, dass die positiv identifizierten Proben nicht deckungsgleich sind, also bei Einsatz jeweils nur eines Verfahrens ungefähr ein Viertel der Proben falsch negative Ergebnisse erbracht hätte. Die bei allen verwendeten Nachweisverfahren am häufigsten isolierte Spezies war *Arcobacter butzleri*.

Die Angaben über die *Arcobacter*-Prävalenz bei Mensch, Tier und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs variieren. Diese Unterschiede sind auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen, die einerseits die Prävalenz der Bakterien, andererseits aber auch die Wiederfindung beeinflussen. So könnten Probenentnahme, Probengrößen und die verwendeten Identifizierungs- bzw. Isolierungsmethoden erhebliche Einflüsse nehmen. Beispielsweise wurde in einer Studie von VAN DRIESSCHE et al. (2003) über Selektivanreicherung eine höhere Anzahl von *Arcobacter* spp. nachgewiesen als über Direktisolierung. Konkret erwiesen sich beim Direktnachweis nur 10 % der Rinderkotproben als *Arcobacter*-positiv, wohingegen bei Anreicherung über 30 % positive Proben auffielen.

Ähnliche Unterschiede in den Isolierungsraten ergaben sich bei den Fäkalproben von Schweinen (28 % im Vergleich zu 44 %), Schafen (5 % im Vergleich zu 16 %) und Pferden (0 % im Vergleich zu 15 %). Weiterhin wurde festgestellt, dass in Abhängigkeit von Direktisolierung oder Anreicherungsverfahren auch der Nachweis der Spezies bzw. Genotypen variieren kann. In Schweine- und Rinderkotproben ließen sich über Direktisolierung neben *A. butzleri* auch *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* anzüchten, mittels Anreicherungsverfahren wurden aber nur *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* isoliert. Diese Befunde könnten durch eine mögliche Konkurrenz unter den Spezies erklärt werden (VAN DRIESSCHE et al. 2003, 2004, 2005).

2.5.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

Das anspruchsvolle Wachstumsverhalten von *Arcobacter*, die unterschiedlichen Nährmedien mit ihren diversen Problematiken und die inerte biochemische Reaktionsfähigkeit gestalten den phänotypischen Nachweis oder gar die Differenzierung der *Arcobacter* spp. schwierig. Diese Schwierigkeiten traten auch schon bei den eng verwandten *Campylobacter* spp. auf (HOUF, 2009). Daher spielen molekularbiologische Untersuchungen eine wichtige Rolle in der *Arcobacter*-Diagnostik. Sie basieren auf dem spezifischen Nachweis von charakteristischen Gensequenzen, die sich unabhängig von der Wachstumsfreudigkeit des Keimes aufzeigen lassen. Dabei ist, zumindest im Zusammenhang mit der Aufklärung von Erkrankungsgeschehen, jedoch zu bedenken, dass sich diese Sequenzen auch aus abgestorbenen Zellen nachweisen lassen.

Bei der AFLP (amplified fragment length polymorphism) wird die DNA durch zwei Restriktionsenzyme in Fragmente zerschnitten. Danach werden mit Hilfe zweier PCR-Reaktionen einige Fragmente amplifiziert. Durch Unterschiede in der Anzahl der Restriktions-Schnittstellen entstehen verschieden lange Fragmente, deren Muster auf einem Elektrophorese-Gel zur Darstellung naher Verwandtschaften genutzt werden kann.

ON et al. (2003) entwickelten aus einem *Campylobacter* Protokoll eine für den Nachweis von *Arcobacter* spp. geeignete AFPL-Analyse. Die Ergebnisse ihrer Studie deuten auf Klonalität der Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* hin.

Eines der inzwischen am besten etablierten Verfahren stellt die PCR (Polymerase Chain Reaction) dar. Die Polymerasekettenreaktion wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Abschnitt eines DNA-Stranges zu vervielfältigen, d. h. zu amplifizieren, so z. B. den gattungs- oder speziesspezifischen Genabschnitt des gesuchten Mikroorganismus. Die Bezeichnung Kettenreaktion beruht darauf, dass die in der jeweils vorangegangenen Vermehrung entstandenen DNA-Abschnitte wiederum als Vorlage für den nächsten Amplifikationszyklus dienen. Benötigt wird die Original DNA (Template), die den zu kopierenden Genabschnitt enthält und unter Anwendung hoher Temperatur zu Einzelsträngen aufgetrennt wird. Dazu gegeben werden zwei Primer, die sich bei für sie charakteristischen Temperaturen an den Einzelsträngen anlagern (Annealing), somit jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und den gesuchten Abschnitt begrenzen. Die Replikation desselbigen erfolgt dann unter Verwendung von Desoxyribonucleinsäuretriphosphaten (DNTPs) im Überschuss durch die DNA-Polymerase (Elongation / Amplifikation). Da die einzelnen Schritte der PCR durch spezifische Temperaturen in Gang gesetzt werden, muss

eine hitzestabile Polymerase, z. B. Taq-Polymerase, verwendet werden. In diesem ersten Amplifikationszyklus ist der gesuchte Abschnitt der Template-DNA verdoppelt worden. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize im Idealfall exponentiell amplifiziert. Die Darstellung erfolgt anschließend in der Agarose-Gelelektrophorese, bei dem das PCR-Produkt anhand seiner Größe nachgewiesen werden kann. Bei einer Multiplex-PCR wird mehr als ein Primerpaar eingesetzt, um zwei oder mehrere Gene eines Pathogenen oder verschiedener Pathogene während eines PCR-Durchgangs zu amplifizieren und nachzuweisen (MULLIS, 1986; IBELGAUFTS, 1993).

Nach der ursprünglichen Einstufung von *Arcobacter* zum Genus *Campylobacter* wurde aufgrund von molekularbiologischen Untersuchungen - wie RFLP, DNA-DNA- und DNA-rRNA-Hybridisierung - *Arcobacter* 1991 einem eigenen Genus zugeordnet (KIEHLBAUCH et al., 1991a, b; VANDAMME et al., 1990, 1991, 1992a). Die *Arcobacter* Spezies wurden durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP, Ribotyping) unterschieden. Dafür wurde die chromosomale DNA extrahiert, mit einem Restriktionsenzym geschnitten und mit 16S rDNA Sonden hybridisiert. Das resultierende DNA-Muster oder Ribotyp des *A. butzleri* unterscheidet sich von dem des *A. cryaerophilus* und kann somit für die Artenbestimmung verwendet werden (KIEHLBAUCH et al., 1991b; SCHROEDER-TUCKER et al., 1996; WESLEY 1995).

In den folgenden Zeiten wurden verschiedene PCR Protokolle für die Detektion von *Arcobacter* entwickelt, die überwiegend auf Gensequenzen in der 23S rRNA und 16S rRNA abzielten. Diese Regionen bieten sich an, da sie ein wesentliches Kernstück eines jeden Bakteriengenoms sind und dabei über sowohl hochkonservierte als auch variable Regionen verfügen (DE RIJK et al., 1993).

Die von MARSHALL et al. (1999) in einem PCR-RFLP Verfahren gewählte 16S rRNA Sequenz dient zur Differenzierung von *Campylobacter jejuni*, *Arcobacter butzleri* und *Helicobacter pylori* Isolaten. Zur Differenzierung von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* wurde das Enzym *TaqI* verwendet, welches zu charakteristischen „Fingerabdrücken“ der einzelnen Spezies führt. Auch HURTADO und OWEN (1999) arbeiteten mit einer PCR-RFLP Analyse zur Detektion von *Campylobacter* und *Arcobacter*. Die hier verwendeten Enzyme ergaben spezifische Nachweise für *A. butzleri* und *A. nitrofigilis*, zeigten jedoch für *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* ein identisches Muster auf. Das Verfahren von GONZALEZ et al. (2000) ermöglicht nach einem kurzen Anreicherungs-schritt einen Nachweis des Genus *Arcobacter* und lässt keine Amplifikate anderer Gattungen zu. Es

wurde als Screening Verfahren darauf ausgelegt, mit wenig Zeitaufwand *Arcobacter*-positive Proben zu ermitteln, zwischen den einzelnen Spezies kann nicht unterschieden werden.

HARMON und WESLEY (1997) entwickelten eine Multiplex-PCR (mPCR), mit der nicht nur Isolate der Gattung *Arcobacter* anhand eines charakteristischen Abschnitts der 16S rRNA Gene, sondern auch der primär für Erkrankungen verantwortliche *A. butzleri* auf Grund einer 23S rRNA Gensequenz detektiert werden konnte. Die *Arcobacter* verdächtigen Isolate wurden über Sero- und Ribotyping sowie durch DNA-Sonden bestätigt. Diese Methode lässt sich als Screening auf *Arcobacter*-positive Proben einsetzen, eine weiterführende Speziesbestimmung ist nicht möglich.

Mit der mPCR-Analyse von HOUF et al. (2000) wurde ein Nachweis für die damals hauptsächlich relevanten *A. butzleri*, *A. skirrowii* sowie für die beiden Subtypen von *A. cryaerophilus* möglich. Dafür wurden folgende 5 Primer verwendet: ARCO-BUTZ, ARCO-SKIR, CRY, CRY 1 und CRY2. Die Zielsequenzen lagen auch in diesem Protokoll im 16S und 23S rRNA Bereich.

Bei der RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) binden kurze Primer zufällig an passende Sequenzen, die Amplifikate erzeugen dann individuelle Bandenmuster, ohne dass das Genom des Bakteriums im Detail bekannt sein muss. Die ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) arbeitet mit Primern, die an repetetive Sequenzen binden.

In einer Studie von HOUF et al. (2002a) wurden die ERIC-PCR und RAPD-PCR-Analyseverfahren für die Charakterisierung von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* optimiert und zusätzlich eine schnellere und einfachere DNA-Extraktionsmethode für die zwei Methoden getestet. Beide Verfahren ergaben zufriedenstellende Ergebnisse für die Typisierung und das diskriminatorische Potenzial, aber die genetischen „Fingerabdrücke“ der ERIC-PCR waren besser reproduzierbar und komplexer als die der RAPD-PCR, so dass die erstgenannte Technik eher empfohlen wurde. Im zweiten Teil ihrer Studie prüften die Autoren die genotypische Diversität der *Arcobacter* Isolate aus Hähnchenschlaktkörpern mit beiden Typisierungsmethoden. Dabei zeigte sich, dass Geflügelprodukte nicht nur verschiedene Spezies, sondern auch mehrere Genotypen einer Spezies beherbergen können. Als Resultat der Untersuchungen ist somit auch festzustellen, dass in epidemiologischen Studien mehrere Ergebnisse in Abhängigkeit von der Isolationsmethode und der Anzahl der charakterisierten Isolate möglich sind.

In einer Veröffentlichung aus jüngster Zeit von COLLADO GONZÁLEZ (2010) bezog der Autor wie folgt zu den molekularbiologischen Nachweistechiken für *Arcobacter* Stellung: Die mPCR nach HOUF ist eine weit verbreitete Methode, jedoch erzeugt sie falsche Zuordnungen zwischen *A. nitrofigilis* und *A. skirrowii* sowie Verwechslungen der letztgenannten mit dem kürzlich entdeckten *A. mytilis* (COLLADO et al., 2009a). Weiterhin gibt es Missdeutungen zwischen dem ebenfalls erst vor kurzem ermittelten *A. thereius* und *A. cryaerophilus* (HOUF et al., 2009).

Eine weitere m-PCR zur Identifikation von Spezies mit humanmedizinischer Bedeutung (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii*) wurde von KABEYA et al. (2003a) beschrieben, eine Methode, welche die zwei DNA Gruppen von *A. cryaerophilus* unterscheiden kann, aber nur wenig Popularität genießt.

Darüber hinaus existieren weitere molekularbiologische Methoden aktuelleren Datums für die Detektion und Identifikation von *Arcobacter*, z. B. die PCR-DGGE (PETERSEN et al, 2007), Real time-PCR (ABDELBAQI et al., 2007; BRIGHTWELL et al., 2007) und eine DNA Microarray Analyse (QUÍÑONEZ et al., 2007). Keine von ihnen ermöglicht indessen, alle anerkannten *Arcobacter* spp. aufzufinden und zu identifizieren. Eine kürzlich vorgestellte Technik, basierend auf 16S rDNA-RFLP Mustern unter Einsatz des Enzyms *MseI*, differenziert einen Großteil der anerkannten Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis* and *A. halophilus* (FIGUERAS et al., 2008). Damit konnten erfolgreich 600 *Arcobacter* Stämme in verschiedenen Untersuchungen identifiziert werden (FIGUERAS et al., 2008; COLLADO et al., 2008, 2009b). Darüber hinaus hat diese Methode dafür gesorgt, dass neue *Arcobacter* spp. wie *A. mytili* aufgefunden wurden (COLLADO et al., 2009a) sowie bisher nicht bestätigte Spezies-Anwärter, wie z. B. *Arcobacter valdiviensis*, auf ihre Anerkennung warten (COLLADO et al, eingereicht). Auch die neue Spezies *A. marinus* lässt sich über ein charakteristisches RFLP Profil nachweisen. Andererseits kann der ebenfalls erst in jüngster Zeit beschriebene *A. thereius* nicht differenziert werden, da er das gleiche Muster zeigt wie *A. butzleri* (COLLADO et al., 2009b) erzeugt. Diese Daten zeigen, dass bis zur Entwicklung einer neuen Identifikationsmethode, die in der Lage ist, sämtliche Spezies, die jetzt noch identische RFLP Profile hervorrufen, gegeneinander abzugrenzen, am besten eine Kombination aus beiden Methoden, der mPCR und der 16S rDNA-RFLP, eingesetzt werden sollte. Bei den Untersuchungen von COLLADO GONZÁLEZ (2010) ließ sich auf diese Weise eine akurate Identifikation aller *Arcobacter* Spezies erzielen (COLLADO GONZÁLEZ, 2010).

FERA et al. (2010a) testeten die Zuverlässigkeit von kultur-abhängigen und kultur-unabhängigen Methoden, indem sie Meerwasserproben aus Süditalien mit PCR und FISH (fluoreszent in situ hybridisation) sowie kulturell nach Anreicherung untersuchten. Die molekularbiologischen Analysen zeigten für alle Proben *Arcobacter*-positive Ergebnisse, die kulturellen jedoch nur für 75 %. Dieses Ergebnis unterstreicht die begrenzte Möglichkeit des kulturellen Nachweises von *Arcobacter* spp. aus naturbelassenen Proben. *Arcobacter*, die sich via kulturellen Verfahrens anzüchten ließen, wurden das ganze Jahr über, ausgenommen im Juli, aufgefunden. Es handelte sich dabei durchweg um Vertreter der Gattung *Arcobacter cryaerophilus*. FERA et al. (2010a) schlussfolgerten aus ihren Studien, dass in der Region Süditaliens ein Umweltreservoir von potentiell pathogenen *Arcobacter* im Meerwasser vorkommt, die sich in einem Status befinden, in dem sie lebensfähig, aber nicht anzüchtbar sind. Dieses Phänomen der viable but nonculturable cells (VBNC) ist auch bei *Campylobacter* spp. bekannt (SINELL, 2004). Die Ergebnisse unterstützen die Untersuchung von FERA et al. (2008), in der festgestellt wurde, dass sich zwei *Arcobacter* Stämme, *A. butzleri* ATCC 49616 sowie ein Umweltisolat im Lebensraum Meerwasser bei 4°C nach 20 Tagen sowie bei Raumtemperatur nach 14 Tagen als nicht mehr kultivierbar erwiesen. Die nicht kultivierbaren Zellen blieben für bis zu 270 Tage in ihrem jeweiligen Mikrokosmos lebensfähig. Die Wiederbelebung war im Anschluss an die Zugabe von Nährstoffen nach 9 Tagen möglich.

In jüngsten Forschungsprojekten erarbeiteten DOUIDAH et al. (2010) eine neuartige Multiplex-PCR Methode mit 7 Primern zur Identifikation der 5 *Arcobacter* spp., die für Mensch und Säugetier relevant sind (*A. butzleri*, *A. skirowii*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* und *A. thereius*), wobei kein PCR Produkt für eng verwandte Bakterien wie *Campylobacter* spp. und *Helicobacter* spp. gebildet wird. Darüber hinaus deckte die Untersuchung des 23S RNA Gens von *A. cryaerophilus* neben der großen Heterogenität dieser Spezies Interventionssequenzen auf, die von 87 bis zu 196 bp reichen.

GONZÁLEZ et al. (2010) entwickelten eine SYBR Green Real-Time PCR für den Nachweis von *Arcobacter* spp. in Lebensmitteln und Abwasser. Die Untersuchungen wurden an Hühner- sowie Abwasserproben durchgeführt und die Ergebnisse mit denen verglichen, die über konventionelle PCR, multiplex PCR und Isolation aus kulturellem Nachweis ermittelt wurden. Die RT PCR zeigte bessere Nachweisraten als die konventionelle PCR und vor allem als die kulturellen Verfahren, darüber hinaus waren kürzere Untersuchungszeiten erforderlich. Demzufolge kann sie für ein schnelles und exaktes Monitoring von *Arcobacter*

Kontaminationen in Lebensmittel- und Wasserproben verwendet werden. Darüber hinaus ergab sich bei der Typisierung im RAPD Profil eine große genetische Heterogenität.

2.5.3 Weitere Nachweismethoden

In ihrer Studie betonten ALISPAHIC et al. (2010), dass eine schnelle und zuverlässige Identifikation von *Arcobacter* und *Helicobacter* spp. von zunehmender Wichtigkeit sei, um diese Gattungen von den phänotypisch ähnlichen *Campylobacter* spp. unterscheiden zu können, zumal viele von ihnen nun Erkrankungen bei Mensch und Tier zugeordnet werden können. Die Matrix-associated laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) MS bezeichneten die Autoren als eine schnelle und sichere Methode zur Charakterisierung von Mikroorganismen. Zugleich richteten sie eine Referenz-Datenbank ein, in der die charakteristischen Massen Spektromie Profile von *Helicobacter*, *Arcobacter* und *Campylobacter* angelegt wurden. Neben den Pathogenen, die bekanntermaßen durch Lebensmittel übertragen werden können, wie *Arcobacter butzleri*, *Helicobacter pullorum*, *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* wurden diverse andere Mitglieder dieser Gattungen in die Datenbank mit aufgenommen, um die Spezies Spezifität des entwickelten MALDI Biotyters zu überprüfen. Die Datenbank wurde mit Stämmen aufgebaut, die auf Columbia Agar wuchsen und reproduzierbare, einzigartige Massen Spektromie Profile aufwiesen, die mit der Bruker Biotyper Datenbank, Version 2, verglichen wurden. Die Referenz Datenbank wurde verwendet, um 144 klinische Isolate abzugleichen. Weiterhin wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Lagerung der Bakterienkulturen überprüft und festgestellt, dass sie sich nach Lagerung bei Raumtemperatur sowie gekühlt bei 4°C bis zu 9 Tage wieder abrufen lassen. Insgesamt weisen die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass die MALDI TOF Massen Spektromie eine schnelle und zuverlässige Methode zur Bestimmung von *Arcobacter* und *Helicobacter* ist und sich für die Anwendung in der klinischen Untersuchung eignet.

Eine gänzlich neuartige Methode publizierten FEDOROVICH et al. (2009) auf, indem sie nachwiesen, dass auch *Arcobacter* spp. zur Exoelektrogenese fähig sind. Exoelectrogene Bakterien sind Organismen, die Elektronen auf extrazelluläre, unlösliche Elektronen Akzeptoren transferieren können und sich somit in Vorrichtungen wie einer Mikroben Kraftzelle (MFC = microbial fuel cells) verwenden lassen. Bis dahin waren Exoelektrogene u. a. in der Klasse der Alpha-, Beta-, Gamma- und Deltaproteobakterien bekannt. Das Wissenschaftlerteam testete zwei Mitglieder des Genus *Arcobacter* mittels Anreicherung in einer Acetat-gesättigten Mikroben Kraftzelle. Einer der Organismen, *Arcobacter butzleri*

Stamm ED-1, verband sich mit der Elektrode und konnte dabei schnell ein starkes elektronegatives Potential erzeugen. Damit war dieser kultur-unabhängige Nachweis auch bei einem Bakterium aus der Klasse der Epsilonbakterien gelungen.

2.6 Tenazität von *Arcobacter* spp.

Aus mikrobiologischer Sicht beschreibt die Tenazität (lat. tenacitas Festhalten, Zähigkeit, Haftvermögen) die Fähigkeit eines Mikroorganismus, auch unter nicht optimalen Bedingungen zu überleben, mithin seine Widerstandsfähigkeit. Eine solche Resistenz kann durch verschiedene Eigenschaften begründet sein, wie zum Beispiel geringe Temperaturempfindlichkeit, hohe pH-Toleranz und vieles mehr. Im Besonderen wird damit charakterisiert, wie lange ein Mikroorganismus in der Umgebung, das heißt außerhalb seines gewohnten Habitats, zu überleben vermag (SPROCKHOFF, 1979).

2.6.1 Einfluss der Temperatur

Arcobacter-Spezies verhalten sich thermotolerant, d. h. sie sind in der Lage, sich in dem weiten Temperaturbereich zwischen 15 und 37°C zu vermehren (JOHNSON und MURANO, 1999b; MANSFIELD und FORSYTHE, 2000).

HILTON et al. (2001) führten Versuche zum Wachstum zwischen 15°C bis 39°C und einem pH-Wert von 6,0 bis 8,0 durch. Dabei wurde eine Vermehrungsfähigkeit zwischen 25°C und 35°C nachgewiesen, ein maximales Wachstum für *Arcobacter butzleri* zeigte sich bei 30°C und einem pH-Wert von 7,0. Die minimale Wachstumstemperatur lag bei 15°C, über 37°C war ein starker Wachstumsrückgang zu verzeichnen, keine Vermehrungsfähigkeit konnte bei 40°C festgestellt werden. Bezüglich der Temperaturgrenzen variieren jedoch die Angaben aus der Literatur. Belegt wurden 40°C als maximale Temperatur durch die Untersuchungen von VANDAMME et al. (1992a) und LEHNER (2005), zumindest für einzelne Stämme wird indessen über ein Wachstum bis 42°C berichtet, eine minimale Vermehrung sogar noch bei 5°C (JOHNSON und MURANO, 1999b; MANSFIELD und FORSYTHE, 2000).

Von entscheidender diagnostischer Bedeutung ist die Wachstumsfähigkeit von *Arcobacter* spp. unter aeroben Bedingungen bei 25°C. Dieses Merkmal wird zur Abgrenzung der nicht thermophilen *Arcobacter* spp. zu den thermophilen *Campylobacter* herangezogen (MANSFIELD und FORSYTHE, 2000; HILTON et al., 2001).

Die dezimale Reduktionszeit (D-Wert) charakterisiert das Absterbeverhalten von Mikroorganismen. Der D-Wert bezeichnet die Zeit, die benötigt wird, um bei einer bestimmten Temperatur 90 % einer Mikroorganismenpopulation abzutöten, also auf 10 % der Ausgangspopulation zu verringern und bildet so ein Maß für die Hitzesensibilität eines Keimes. Der D-Wert ist stets temperaturabhängig, dieser Zusammenhang wird mit dem z-Wert beschrieben. Dieser Wert gibt an, um wie viel Grad die Temperatur erhöht werden muss, um den gleichen Abtötungseffekt in einem Zehntel der Zeit zu erreichen.

Konkret führten HILTON et al. (2001) Untersuchungen zur Thermotoleranz der Bakterien in Bouillon-Kultur durch. *A. butzleri* besaß bei 55°C eine dezimale Reduktionszeit von 0,4 min. für Zellen aus der stationären Wachstumsphase und 1,1 min. für Zellen in der exponentiellen Phase. Ähnliche Daten der D-Werte sind von *C. jejuni* (55°C, 0,64 – 1,09 min.) bekannt (BLANKENSHIP und CRAVEN, 1982).

Vergleichbare Studien liegen von D'SA & HARRISON (2005) vor, indem sie die Empfindlichkeit von *Arcobacter* gegenüber verschiedenen umwelt- und lebensmittelbedingten Stressfaktoren ermittelten. Der D-Wert wurde aus Kulturen von drei *A. butzleri* Stämmen in Phosphat-gepufferter Salzlösung bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. In der Lösung mit einem pH von 7,3 ergab sich bei 60°C ein D-Wert von 0,07 – 0,12 min, bei 55°C von 38 – 0,76 min und bei 50°C von 5,12 – 5,81 min. Bei dem weiterhin geprüften pH-Wert von 5,5 zeigte sich gleichfalls eine abgestufte Thermotoleranz der Keime: D-Wert von 0,03 – 0,11 min bei 60°C, 0,30 – 0,42 min bei 55°C und 1,97 – 4,42 min bei 50°C. Das Autorenteam resümierte, dass die Kombination von Hitze und gesenktem pH zu einem Abfall der D-Werte führte.

Wie auch später von VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) beschrieben, spielt das Medium, das zur Bestimmung der D-Werte benutzt wird, eine erhebliche Rolle. D'SA & HARRISON (2005) ermittelten mit 18,51 min bei 50°C und 2,18 min bei 55°C erheblich höhere D-Werte der drei getesteten *A. butzleri* Stämme aus rohen Schweinehackfleisch als bei Salzlösung als Substrat. Der von D'SA & HARRISON (2005) ermittelte z-Wert beträgt 5,2 – 6,28°C, der von HILTON et al. (2001) bestimmte z-Wert für die *A. butzleri* Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase ergab 8,1°C, für die stationäre Phase 7,4°C.

Tabelle 4: D-Wert Ermittlung von D'SA & HARRISON (2005) und HILTON et al. (2001) unter verschiedenen Bedingungen

Temperatur [°C]	D'SA & HARRISON (2005)		HILTON et al. (2001)	
	pH	D-Wert [min]	Wachstumsphase	D-Wert [min]
50°C	7,3	5,12 – 5,81	exponentiell	2,1
	5,5	1,97 – 4,42	stationär	1,7
	in Hack	18,51		
55°C	7,3	0,38 – 0,76	exponentiell	1,1
	5,5	0,30 – 0,42	stationär	0,4
	in Hack	2,18		

VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) führten eine Studie durch, in der die Temperaturgegebenheiten, die in der Lebensmittelindustrie vorkommen, mit und ohne Nährstoffe simuliert wurden. Es erfolgte eine quantitative Erfassung in definierten Zeitabständen aus Inkubationen in purem Wasser sowie Wasser mit zugesetztem organischem Material bei 4°C, 7°C und 20°C sowie 52°C, 56°C und 60°C. Dieses Temperaturspektrum sollte das Überleben zum einen unter Lager- und Produktionsraumtemperaturen, zum anderen unter Brühwasserbedingungen demonstrieren. Darüber hinaus wurden neben *A. butzleri* erstmals weitere *Arcobacter* spp., nämlich *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*, in die Untersuchungen einbezogen. Alle *Arcobacter* Spezies blieben sowohl mit als auch ohne Zusatz von Nährstoffen in dem Medium Wasser für einen temperaturabhängigen Zeitraum überlebensfähig. Dabei zeigte sich *A. butzleri* als hitzeresistenter und länger nachweisbar als *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Der Zusatz des organischen Materials erwies sich nur bei den niedrigeren Temperaturen als lebensverlängernd, bei den höheren Temperaturen überlebten die Keime insgesamt länger als erwartet. Nach Anreicherungs-schritten ließen sich alle getesteten Spezies bedeutend länger wiederfinden als bei unmittelbarer Isolation via Spiralplattenverfahren. Die stärksten Differenzen innerhalb einer Spezies wurden bei *A. cryaerophilus* ermittelt, die sich über seine weitreichende genetische Heterogenität erklären lassen. Im Vergleich zu *Campylobacter* (33 Tage) überleben *Arcobacter* bei 4°C Kühlung signifikant länger (*A. butzleri*: 98 Tage, *A. cryaerophilus*: 56 Tage, *A. skirrowii*: 42 Tage).

Das Autorenteam postulierte daher, dass Wasser als Reservoir dienen und eine *Arcobacter*-Kontaminationsquelle für Mensch und Tier bilden kann. Gleichzeitig gaben sie zu bedenken, dass *in-vitro*-Studien zwar wichtige Informationen hinsichtlich der Überlebensfähigkeit geben können, die jedoch deutliche Grenzen haben. Unsicherheiten basieren auf dem Versuchsdesign, denn die Isolationsrate hängt stark von der verwendeten Methode, dem pH und der Matrix ab, weiterhin unterscheiden sich ggf. Feld- und Referenzstämme gravierend voneinander.

2001 beschäftigten sich HILTON et al. auch mit den Effekten von Kühlen bei 4°C und Tiefgefrieren bei -20°C auf *A. butzleri*. Nach 21 Tagen Lagerung bei 4°C bzw. -20°C ließen sich die Stämme noch auf dem nicht-selektiven Blutmedium anzüchten, eine subletale Schädigung verhinderte jedoch das Wachstum auf den Selektivmedien CAT und CCDA. Die Keime in der exponentiellen Wachstumsphase erwiesen sich, wie im oberen Abschnitt erwähnt, als resistenter gegenüber Hitzeeinwirkung im Vergleich zu Zellen aus der stationären Phase. Bei Kälteeinwirkung zeigte sich interessanter Weise ein gegenteiliger Effekt.

Die Lagerung bei 4°C bewirkte bei den Keimen der stationären Wachstumsphase einen kontinuierlichen Abfall der Zellzahl mit fortschreitender Verweildauer um ca. 4 Log Stufen in 14 Tagen (von 10^9 auf 10^5 KbE/ml), wohingegen beim Tiefgefrieren von -20°C ein rascher Abfall von 2 Log Stufen innerhalb von nur 24 Stunden erfolgte, die Zellzahl danach jedoch annähernd gleich blieb. Für die Mikroorganismen aus der exponentiellen Phase wurde ein rasanter Untergang der Zellen um 4 Log Stufen in 24 Stunden ermittelt, nach 7 Tagen zeigte sich kein Wachstum mehr.

D'SA und HARRISON (2005) berichteten, dass die Kombination von moderater Hitze (50°C) mit anschließender Kältebehandlung (4° bis 8° C) einen synergistischen Einfluss auf die Letalität der Erreger nahm. Die Untersuchungen zeigten eine Verringerung der Zellzahl, die deutlich über den Ergebnissen einer alleinigen Hitze- oder Kältebehandlung lag.

2.6.2 Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert als dimensionsloses Maß für die saure bzw. alkalische Eigenschaft eines Mediums bildet eine wesentliche Einflussgröße auf das Wachstum von Mikroorganismen.

MANSFIELD und FORSYTHE (2000) berufen sich in ihren Angaben auf NEILL et al. (1985). Dabei war ein Wachstum möglich zwischen pH 6,8 und 9,5 wobei die Mehrheit der Stämme

zwischen 6,8 und 8,0 wächst. Gemäß HILTON et al. (2001) war eine optimale Vermehrung bei einem pH von 6,0 bis 8,0 in der 30°C Inkubation zu verzeichnen, das minimale pH Limit wurde mit 5,5 bei 37°C ermittelt.

D'SA & HARRISON (2005) untersuchten das Wachstum *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* in einem pH Bereich von 3,5 bis 8,0. Für die meisten Stämme konnte eine Vermehrung zwischen pH 5,5 und 8,0 detektiert werden, kaum bis kein Wachstum zeigte sich bei 5,0 oder niedriger. Dabei wurde eine unterschiedliche Wachstumsdichte der verschiedenen Stämme innerhalb einer Spezies beobachtet.

Für *A. butzleri* zeigte sich bei der 25°C-Inkubation über 24 h bei einem pH von 5,5 eine höhere Vermehrungsrate als bei gleichem pH-Wert, aber 37°C-Bebrütung. Nach längerer Inkubation von 5 Tagen war auch bei 25°C ein stärkeres Wachstum zu verzeichnen.

Eine insgesamt minimale Vermehrung zeigten die zwei *A. cryaerophilus* Stämme. Das Autorenteam gab als optimalen pH für *A. butzleri* 6,0 bis 7,0 an, *A. cryaerophilus* toleriert einen etwas engeren Bereich von 7,0 bis 7,5. Diese Angaben untermauern die Ergebnisse aus der Studie von HILTON et al. (2001).

pH-Werte unter 4 erwiesen sich als letaler Faktor für *Arcobacter*, jedoch ist dieser pH-Grenzwert abhängig von der Säureart und den anderen Wachstumsfaktoren (PHILLIPS und BATES, 2004).

Die vergleichende Betrachtung mit *Campylobacter* kommt zu ähnlichen Ergebnissen, denn PARK (2005) berichtet von einem optimalen pH-Wert bei pH 6,5 bis pH 7,5 wobei Extreme wie pH 4,9 und pH 9 toleriert werden.

2.6.3 Einfluss des a_w -Wertes

Die Wasseraktivität (auch a_w -Wert oder Activity of Water) stellt ein Maß für ungebundenes und somit frei verfügbares Wasser in einem Material dar. Sie wird definiert als Quotient des Wasserdampfdrucks über einem Substrat (p) zu dem Wasserdampfdruck über reinem Wasser (p_0) bei einer bestimmten Temperatur. Angegeben wird der a_w -Wert in einer Zahl zwischen 0 und 1, wobei 1 dem Wert von reinem Wasser entspricht. Der Gehalt an frei verfügbarem Wasser stellt ein maßgebliches Kriterium für die Vermehrungsmöglichkeit von Mikroorganismen dar. Bei den meisten frischen Lebensmitteln wird die Wasserverfügbarkeit mit Werten zwischen 0,98 und 0,99 angegeben, dieser Bereich bietet für viele Bakterien, insbesondere Pathogene, optimale Bedingungen. Einflussgrößen auf den a_w -Wert bilden nicht nur der Abtrocknungsgrad eines Lebensmittels, sondern v. a. auch gelöste Stoffe und deren Ionen, insbesondere der Gehalt an Kochsalz. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*

tolerieren eine NaCl-Konzentration von 2 % gut (a_w -Bereich 0,984 – 0,987). Beispielsweise konnten ATABAY et al. (2003) nachweisen, dass alle 49 *A. butzleri* Isolate aus Hühnerschlachtkörpern bei 2 % NaCl in der Lage waren, sich zu vermehren, hingegen ließ sich keine Vitalität bei 4 % NaCl zu verzeichnen. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Studien von D'SA & HARRISON (2005), die eine obere Wachstumsgrenze für *A. butzleri* bei 3,5 % und für *A. cryaerophilus* bei 3,0 % NaCl-Gehalt feststellten. Der optimale Wachstumsbereich bei einer 24 Stunden Inkubation lag bei 0,5 bis 1,0 % NaCl für *A. cryaerophilus*, bei einer 96 stündigen Bebrütung wurden 0,5 bis 2,0 % und für *A. butzleri* 0,09 bis 0,5 % als günstigste Konzentration ermittelt. Insgesamt zeigte sich ein variierendes Wachstum der einzelnen Stämme in der 96 Stunden Studie. Einzelne Referenzstämme überlebten bei 25°C eine Konzentration von 5 % Kochsalz. Insgesamt erweist sich eine NaCl-Konzentration von 0,5 % für *Arcobacter* als optimal, dementsprechend wird sie auch in den *Arcobacter*-Selektivmedien eingesetzt. Ob höhere Salzkonzentrationen toleriert werden, hängt von den weiteren Bedingungen, wie z. B. der Temperatur, ab.

Die Resistenz gegen Austrocknung wurde von OTTH et al. (2001) an 11 *Arcobacter butzleri* Feldstämmen, isoliert aus Hühnerlebern, überprüft. Während die minder resistenten Stämme bereits nach zwei Stunden kein Wachstum mehr zeigten, konnten 6 Stämme über 12 Stunden dem Trocknungsprozess widerstehen, zwei davon sogar über 48 Stunden. Die Resistenz ist folglich von Stamm zu Stamm unterschiedlich ausgeprägt.

Diese Feststellung untermauert die Aussage von HAZELEGER et al. (2003). Ihm zu Folge ist *A. butzleri* in der Lage, auf Stahloberflächen länger als vier Tage zu überleben. OTTH et al. (2001) folgerten, dass sich *A. butzleri* widerstandsfähiger gegenüber Austrocknung verhält als *Campylobacter* spp., deren Resistenz zwischen zwei und zehn Stunden liegt (FERNÁNDEZ et al., 1995).

Den Einfluss einer Kombination aus pH- und a_w -Wert auf das Wachstum von *Arcobacter butzleri* und *Arcobacter cryaerophilus* bei 30°C ermittelten ČERVENKA et al. (2003). Dabei wurde der pH durch schwache organische Säuren (siehe Kapitel 2.6.4) und der a_w durch Kochsalz, Glycerin und Saccharose eingestellt. Beide Spezies reagierten ausgesprochen sensibel auf einen a_w unter 0,980.

2.6.4 Einfluss von Säuren und Konservierungsmitteln

Von besonderem Interesse ist die Wirkung von organischen Säuren und ähnlichen Substanzen, die als Konservierungsstoffe oder zumindest als Stoffe mit konservierender Wirkung in Lebensmitteln zum Einsatz kommen.

In der eben genannten Studie von ČERVENKA et al. (2003) zum Einfluss von pH und Wasseraktivität auf das Wachstum von *Arcobacter butzleri* und *Arcobacter cryaerophilus* erbrachte ein mittlerer pH-Wert den größeren Effekt, denn im Vergleich zu Propion-, Milch-, Apfel- und Ascorbinsäure (pH 5,5 bis 5,0) wirkten Ameisen-, Zitronen- und Weinsäure mit dem pH-Bereich 6,0 bis 5,5 stärker hemmend. Das Autorenteam zog die Schlussfolgerung, dass die Empfindlichkeit gegenüber a_w und pH eine wichtige Einschränkung für die Verteilung und das Überleben von *Arcobacter* spp. in Lebensmitteln und Lebensmittelzubereitungen bedeutet.

Die geschilderten Ergebnisse harmonieren mit Veröffentlichungen aus der Vergangenheit. PHILLIPS (1999) untersuchte die Wirkung von Zitronensäure, Milchsäure sowie ihrer Natriumsalze (allein und in Kombination mit Nisin) auf *Arcobacter butzleri*. Milch- und Zitronensäure in Konzentrationen von 0,5 %, 1,0 % und 2,0 % hinderten *Arcobacter butzleri* am Wachstum, wobei die Zitronensäure stärker wirksam war, d. h. bereits in einer Konzentration von 0,5 % ließen sich keine vermehrungsfähigen Zellen mehr nachweisen. ČERVENKA et al. (2004) bestätigten diese Resultate, indem 2 %iges Natriumlaktat für eine effiziente Vermehrungshemmung bei einer Inkubation über 8 Stunden sorgte, nicht jedoch über einen längeren Inkubationszeitraum. Natriumcitrat wirkte effektiver als Natriumlaktat, wobei die geringe Konzentration die gleiche Hemmung wie die höhere Konzentration erzielte (PHILLIPS, 1999).

SKŘIVANOVÁ et al. (2010), testeten den inhibitorischen Effekt von 17 organischen Säuren (C_2 – C_{16} Fettsäuren, Sorbinsäure, Benzoesäure, Phenylacetyl, Fumarsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Apfelsäure und Zitronensäure) auf das kulturelle Wachstum von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Die Keime zeigten sich empfindlich gegenüber allen angewandten Säuren. Dabei ergab sich folgende absteigende Empfindlichkeit: *A. skirrowii* < *A. cryaerophilus* < *A. butzleri*. Weiterhin wurde an mit *Arcobacter* inokulierten Hühnerkarkassen untersucht, inwieweit die Anwendung der Säuren die Keimbelastung reduziert. Der stärkste inhibitorische Effekt bestand für Benzoesäure, Zitronensäure, Apfelsäure und Sorbinsäure. Unter Berücksichtigung der geringsten sensorischen Beeinflussung erbrachte die Benzoesäure den günstigsten Effekt.

Nisin ist ein antibiotisch wirksames Peptid, das von dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* produziert wird und z. B. in roher Milch vorkommt. In der Studie von PHILLIPS (1999) zeigte es im alleinigen Einsatz eine hemmende Wirkung und bei gleichzeitiger Anwendung

verstärkte es signifikant den Effekt von Natriumlaktat. Ein entsprechender Effekt konnte für die Kombination mit Natriumcitrat nicht nachgewiesen werden.

In einer Studie von PHILLIPS und DUGGAN (2001) wurde der Einfluss von EDTA (Ethylendiamintetraacetat) und Triphosphat sowie deren Wirkung in Kombination mit Nisin auf *Arcobacter butzleri* getestet. Nisin wirkte in erster Linie gegen gram-positive Bakterien, aber auch gegen gram-negative Mikroorganismen, wenn deren äußere Zellmembran durch andere Stoffe bereits angegriffen war. Diese Vorschädigung kann z. B. durch Triphosphat oder EDTA erfolgen. Ein kombinierter Einsatz der Stoffe zeigte jeweils eine stärkere Reduktion der *Arcobacter* Zellen. Zusammenfassend folgerte das Autorenteam daher, dass der Einsatz von multiplen Hürden die intensivste Hemmung der Keime bewirkt.

Die Ergebnisse bezüglich Triphosphat und Milchsäure konnten von HAZELEGER et al. (2003) bestätigt werden. Weiterhin ermittelte dieses Autorenteam, dass Glycin (1 %), Tween 80 sowie die quartäre Ammoniumverbindung Cetylpyridiniumchlorid keinen Hemmeffekt auf *Arcobacter butzleri* ausübten.

2.6.5 Einfluss von Bestrahlung

Das Vorkommen der *A. butzleri* bei Geflügel und rohem Fleisch, insbesondere bei Schweinehackfleisch, veranlasste Untersuchungen zur Bestimmung seiner Sensitivität gegenüber Bestrahlung. Die D_{10} -Werte (die Strahlendosis, welche die Zahl der lebendigen Bakterien um den Faktor 10 reduziert) in vakuumverpackten Schweinehack ergaben für *A. butzleri* mit 0,27 kGy einen 1,4 fach höheren D_{10} -Wert als für *Campylobacter jejuni* mit 0,19 kGy. Eine Bestrahlung mit 1,5 kGy verminderte die Anzahl von *Arcobacter* Zellen um 5 Zehnerpotenzen, die Dichte von *Campylobacter* Zellen sogar um 7 Zehnerpotenzen. Diese Strahlendosis würde somit *Campylobacter* und *Arcobacter* mit hinreichender Sicherheit aus Schweinehackfleisch eliminieren (COLLINS et al., 1996b).

2.6.6 Verhalten gegenüber Metallen

Anhand von 50 *A. butzleri*-Feldstämmen wurde untersucht, ob bei dieser Spezies eine Empfindlichkeit in Bezug auf Schwermetalle zu Eigen ist. Ein derartiger Effekt konnte für Quecksilber, Silber und Chrom nachgewiesen werden, alle Stämme erwiesen sich jedoch als widerstandsfähig gegenüber Molybdän, Mangan, Nickel, Cobalt, Blei und Eisen.

Die gefundenen MIC-Werte zeigten indessen eine hohe Variabilität, was auf ein nicht gleichförmiges Verhalten der Stämme hinweist (OTTH et al., 2005). Die unterschiedliche

Sensibilität kann sogar als Unterscheidungskriterium genutzt werden, *A. butzleri* zeigte sich z. B. gegenüber Cadmiumchlorid resistent, *A. cryaerophilus* hingegen sensibel (SCHROEDER-TUCKER et al., 1996).

2.6.7 Antibiotika

Über das Verhalten gegenüber Antibiotika wurde bereits ausführlich in Kapitel 2.5.1 im Zusammenhang mit den Untersuchungen von HOUF et al. (2001a) hinsichtlich der Anwendung von Antibiotika in Nährmedien berichtet. Der hemmende Effekt von verschiedenen Gewürz- und Heilpflanzenextrakten auf *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* wurde in Untersuchungen von CERVENKA et al. (2006) ermittelt. Generell - wenn auch verschieden stark ausgeprägt - zeigte sich eine antimikrobielle Wirkung. Diese fiel bei Zimt-, Kamillen-, Salbei- und Rosmarinextrakten besonders stark aus.

Abschließend lässt sich feststellen, dass *Arcobacter* insgesamt eine höhere Tenazität gegenüber den verschiedenen Einflussfaktoren als *Campylobacter* spp. zeigten (COLLINS et al., 1996b; HAZELEGER et al., 2003; OTTH et al., 2001; PHILLIPS und DUGGAN, 2001; VAN DRIESSCHE und HOUF, 2008).

2.7 Pathogenese

Über die Pathogenese oder potentielle Virulenzfaktoren von *Arcobacter* spp. ist bislang immer noch wenig bekannt. Die ersten Studien diesbezüglich wurden an Ratten durchgeführt, im Ileum-Schleifen-Model verursachten zwei *A. cryaerophilus* Isolate ein Ansteigen der Elektrolytkonzentration und eine Ansammlung von Flüssigkeit. Außerdem zeigten sie eine *in vitro* Invasion von Hep-2 Zellen (FERNANDEZ et al., 1995). Andere Studien demonstrierten, dass *A. butzleri* Ferkel und Hühnerküken kolonisieren konnte (WESLEY et al., 1996b, WESLEY und BAETZ, 1999). Im Vergleich zu *Campylobacter* spp. weiß man nahezu nichts über die Gene, die in Virulenzmechanismen eingebunden sind. Kürzlich wurde die Sequenz des gesamten Genoms von *A. butzleri* veröffentlicht, die nahelegt, dass vermeintliche Virulenzhomologien zu *C. jejuni* vorliegen, wie zum Beispiel fibronectin binding protein CadF und Cj1349. Es ist jedoch unklar, in wieweit diese als Virulenzdeterminanten bei *A. butzleri* in Funktion treten, oder ob sie in der engen familiären Verwandtschaft zu *Campylobacter* begründet liegen (MILLER et al., 2007).

Eine Studie aus neuerer Zeit wurde in Berlin geführt. BRÜCKER et al. (2009) inokulierten menschliche HT-29/B6 Dickdarmepithelien apikal mit *A. butzleri*. Transepithelialer Widerstand und Makromolekülflüsse wurden in Ussing-Kammern gemessen, die Expression von Tight junction Proteinen via Western blot und subzelluläre Verzweigungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Es zeigten sich verschiedene Effekte, die zusammenfassend wie folgt beschrieben werden können: Die *A. butzleri* bedingte Diarrhoe wird verursacht von Dysfunktionen der Epithelialbarriere durch die Veränderung der Tight junction Proteine und der epithelialen Apoptose.

3 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte die Nachweismöglichkeit von *Arcobacter* spp. bei Hähnchen- und Rindfleischproben aus dem Berliner Einzelhandel geprüft sowie Daten über ihre Häufigkeit erhoben werden. Bei den Proben handelte es sich um zufällig ausgewähltes, frisches Rinderhackfleisch und Geflügelteilstücke (Hähnchenschenkel) von 7 Supermärkten und 9 Fleischereien. Als Nachweisverfahren wurden zum einen die von JOHNSON und MURANO (1999) empfohlene kulturelle Methode und zum anderen auf molekularbiologischer Ebene das von HARMON und WESLEY (1997) entwickelte Multiplex PCR Verfahren ausgewählt.

Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung von Lebensmitteln auf eine Kontamination mit *Arcobacter* spp. wurden 75 Rinderhack- und 103 Geflügelfleischproben aus dem Berliner Einzelhandel in der Zeit vom 05.01.2001 bis zum 10.05.2003 gezogen. Dabei wurden Fertigpackungen aus der Kühltheke als auch Ware aus loser Abgabe erworben. Der zeitliche Abstand zwischen den Käufen in den einzelnen Geschäften sicherte ab, dass jeweils neue Chargen vorlagen.

Geflügel

Die Geflügelfleischproben stammten aus 6 Berliner Supermärkten und 5 Fleischereien. Von den Fleischereien boten 2 ausschließlich Produkte von Tieren aus ökologischer Haltung an, ein weiterer Betrieb Fleisch von Tieren aus ökologischer und konventioneller Haltung und zwei Unternehmen vertrieben ausschließlich Fleisch von Tieren aus konventioneller Haltung.

Die Proben von Tieren aus ökologischer Haltung stammten sowohl aus den genannten Fleischereien als auch aus 2 Supermärkten, die neben Fleisch von Tieren aus konventioneller auch solches von Tieren aus ökologischer Haltung anboten.

Rind

Die Rinderhackproben wurden in 6 Berliner Supermärkten und 3 Fleischereien aufgekauft. Eine Fleischerei vertrieb ausschließlich Fleisch von Tieren aus ökologischer Haltung, dieser Umstand wurde in den Versuchen jedoch nicht separat aufgeführt.

Probennahme

Am Vortag bzw. direkt am Untersuchungstag wurden die Proben erworben, in Isoliertaschen mit Gefrierenlementen zum Institut für Lebensmittelhygiene verbracht und bis zur Untersuchung im Probenkühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.1 Kultureller Nachweis von *Arcobacter*

3.1.1 Medien

Rezeptur der Medien

JM- Anreicherungsbouillon (nach Johnson und Murano, 1999)

In den Versuchen am Institut wurde die kulturelle Methode nach JOHNSON und MURANO (1999) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Anreicherungsbouillon und ein Plattenmedium, die in der Nährbodenküche des Institutes selbst hergestellt wurden, basierend auf der Original-Rezeptur.

Rezeptur der JM-Anreicherungsbouillon (1 Liter):

Spezial Pepton Nr. 2:

12 g/l	Spezial Pepton	Oxoid
6 g/l	Fleischextrakt Rind	Oxoid
6 g/l	Hefeextrakt	Merck
4 g/l	NaCl	Merck
2,5 g/l	monobasisches Natriumphosphat	Merck
1,6 g/l	dibasisches Kaliumphosphat	Roth
sowie		
0,5 g/l	Thioglycolat	Sigma-Aldrich
2,5 g/l	Gallensalze Nr. 3	Oxoid
2 g/l	Agar	Merck
30 g/l	Aktivkohle	Sigma-Aldrich

Die genannten Komponenten wurden mit 790 ml Aqua destillata (Aqua dest.) aufgefüllt und anschließend für 15 min bei 121°C autoklaviert. In dieser Zeit wurden die verbleibenden, nicht autoklavierbaren Bestandteile, in 210 ml Aqua dest. aufgelöst, wobei zu beachten ist, dass das 5-Fluorouracil schwerlöslich ist und daher frühzeitig angesetzt werden muss. Nach einer Abkühlung auf 50°C wurden diese dann steril filtriert zugesetzt:

0,5 g	Pyruvat	Sigma-Aldrich
0,032 g	Cefoperazon	Sigma-Aldrich
0,2 g	5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich

JM-Plattenmedium (1 Liter) (nach JOHNSON und MURANO, 1999)

Spezial Pepton Nr. 2:

12 g/l	Spezial Pepton	Oxoid
6 g/l	Fleischextrakt Rind	Oxoid
6 g/l	Hefeextrakt	Oxoid
4 g/l	NaCl	Merck
2,5 g/l	monobasisches Natriumphosphat	Merck
1,6 g/l	dibasisches Kaliumphosphat	Roth
sowie		
0,5 g/l	Thioglycolat	Sigma-Aldrich
12,5 g/l	Agar	Merck
0,5 g/l	Pyruvat	Sigma-Aldrich
0,032 g/l	Cefoperazon	Sigma-Aldrich
50 ml	Schafblut, defibriniert	Oxoid

BHI-Bouillon

BHI- Bouillon – Brain-Heart-Infusion: Hirn-Herz-Glucose Bouillon Merck

BHI-Bouillon eignet sich gut zur Anzucht anspruchsvoller Keime und kam in den durchgeführten Versuchen für den Beweglichkeitstest im hängenden Tropfen zum Einsatz.

Weitere verwendete Medien

PC

Plate-Count-Agar (Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt) (Merck)

NA

Nähragar (Merck)

Zur Anzucht auf *Campylobacter* Medien:

Karmali Agar

Campylobacter Agar Base (Karmali) (Oxoid)

mit Campylobacter Selektive Supplement (Karmali) (Oxoid)

Preston Broth

PRB Anreicherungsbouillon: Nutrient Broth No. 2 (Oxoid)

mit Preston Campylobacter Selective Supplement (Oxoid)

sowie Campylobacter Growth Supplement (Oxoid)

und sterilem Pferdeblut, lysiert: 50 ml/l (Oxoid)

Preston Plate

Campylobacter Agar Base (Oxoid)

mit Preston Campylobacter Selective Supplement (Oxoid)

sowie steriles Pferdeblut, lysiert: 50 ml/l (Oxoid)

Die Herstellung der Nährmedien erfolgte gemäß Herstelleranweisung unter Beachtung der üblichen Guten Laborpraxis. Näheres zu Inhaltsstoffen und Zubereitung sowie weitere Medien (siehe auch 3.1.4) sind im Anhang dargestellt.

Reagenzien, Materialien und Geräte

Gramfärbung

- Grams Kristallviolett Lösung Merck
- Lugols Lösung stabilisiert Merck
- Entfärbelösung Merck
- Grams Safranine Lösung Merck

Cytochromoxidasetest

- Oxidase – Test Merck

Katalasetest

- 3%ige H₂O₂-Lösung

Materialien und Geräte

- Anaerobiertöpfe Merck, Typ Anaerocult
- Stomacher Interscience,
Typ BagMixer 400
- Probenbeutel Bag Page™ R, 400 ml Interscience, Frankreich
- Brutschrank 30 °C Memmert, Schwabach
- Brutschrank 25°C Memmert, Schwabach
- Brutschrank 37°C Memmert, Schwabach
- Brutschrank 42°C Memmert, Schwabach
- Brutschrank 44°C Heraeus, Hanau
- Enterotube™ II ID-Testkit Becton Dickinson, USA
- Katalase Bactident® Merck, Darmstadt
- Oxidase Bactident®-Teststreifen Merck, Darmstadt
- Petrischalen (90 mm Ø) Greiner bio-one
- CampyGen™ Oxoid, Wesel
- AnaeroGen™ Oxoid, Wesel
- Anaerobic Indicator™ Oxoid, Wesel

- Waagen Sartorius, Typ 4100,
3600, LP 4200 S
- Mikrobank Mast Diagnostika,
Cryobank™
- Mikroskop Carl Zeiss,
Typ Standard KF 2
- Pinzette, Schere, Ösen (Ø 3 - 4 mm)
- Stomacherbeutel, steril mit Filtereinsatz (bagpage, Interscience)
- Weithalslerlenmeyerkolben
- Objektträger
- Hohlsliffobjektträger, Deckgläser, Vaseline

Referenzstämme

Die Stämme der *Arcobacter*-Kulturen wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Folgende Stämme kamen zum Einsatz:

- *A. butzleri* DSMZ, DSM-Nr. 7301
- *A. butzleri* DSMZ, DSM-Nr. 8739
- *A. cryaerophilus* DSMZ, DSM-Nr. 7289
- *A. skirrowii* DSMZ, DSM-Nr. 7302
- *A. nitrofigilis* DSMZ, DSM-Nr. 7299

Herstellung der Medien

JM-Anreicherungsbouillon

In der vorliegenden Studie wurde die *Arcobacter*-Anreicherungsbouillon verwendet, wie sie zu Beginn dieses Kapitels (Rezeptur der Medien) aufgeführt ist. Die Herstellung der Bouillon begann mit dem Einwiegen der Zutaten des Spezial Pepton Nr. 2. Dieses setzt sich zusammen aus Fleischextrakt, Hefeextrakt, Natriumchlorid, Natriumphosphat sowie Kaliumphosphat.

Gallensalze und Aktivkohle wurden zugegeben, aufgefüllt mit 790 ml Aqua dest. und auf einem Magnetrührer aufgelöst, anschließend wird der Ansatz in einem Autoklaven für 15 min bei 121°C sterilisiert. Die Entnahme des Nährbodenansatzes aus dem Autoklaven erfolgte bei einer Temperatur von 70 bis 80°C, um dann auf dem Magnetrührer weiter auf ca. 50°C abgekühlt zu werden. Danach wurden die beiden vorbereiteten Lösungen steril filtriert zugegeben, da deren Bestandteile nicht autoklavierbar sind. Die eine Lösung wurde mit dem schwerlöslichen 5-Fluoruracil in 200 ml Aqua dest. mit Hilfe eines Magnetrührers während der sonstigen Zubereitungszeit angesetzt, die andere Lösung enthielt das Cefoperazon und das Pyruvat. Nach gleichmäßigem Vermischen wurden je 90 ml in sterile Steilbrustflaschen abgefüllt. Der pH Wert der JM- Anreicherungsbouillon lag bei $7,0 \pm 0,2$.

JM- Plattenmedium

Zur Herstellung von 1 Liter festem Nährmedium wurden die bei der Rezeptur des JM-Plattenmediums aufgeführten Nähr- und Zusatzstoffe in den entsprechenden Konzentrationen eingewogen. Anschließend wurden Spezial Pepton Nr. 2, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Natriumchlorid, Natriumphosphat und Kaliumphosphat in 990 ml Aqua dest. unter Rühren mit einem Magnetrührer vollständig gelöst, und das zubereitete Plattenmedium im Autoklaven für 15 min. bei 121°C sterilisiert. Der Nährbodenansatz wurde mit einer Temperatur von 70 bis 80°C dem Autoklaven entnommen und unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt.

Die anschließende Zugabe von 50 ml defibriniertem Schafblut und der vorbereiteten Antibiotikalösung diente dazu, den Nährgehalt und die Selektivität des Mediums zu erhöhen. Die Lösung enthielt Pyruvat und Cefoperazon, gelöst in 10 ml Aqua dest., sie wurde steril filtriert zugegeben, das Schafblut hinzugefügt und der gesamte Ansatz vorsichtig vermischt. Der pH Wert des JM- Mediums soll bei $7,0 \pm 0,2$ liegen. Nachdem die Platten bestückt worden sind, mussten sie zum Verfestigen abkühlen und trocknen. Bei der Herstellung einer neuen Charge Nährmedien wurde jeweils eine Sterilkontrolle geprüft (aerobe Inkubation bei 30°C, 48 Stunden). Vorrätig gehalten wurden das flüssige wie auch das feste Medium in der Nährmedien-Kühlzelle bei 7°C.

3.1.2 Probenaufbereitung und Kultivierung

Für den Probenansatz wurden von jeder Probe 25 g Untersuchungsmaterial benötigt, die mit steriler Pinzette und Schere entnommen wurden. Die Sterilität der Entnahmegeräte wurde

durch Eintauchen in Alkohol und anschließendem Abflammen erreicht. Die Abnahme bei dem Rinderhackfleisch erfolgt aus der Mitte des Probenmaterials, die Entnahme aus den Hähnchenschenkeln umfasste Haut einschließlich Unterhaut sowie die darunter liegende Muskulatur, um möglichst repräsentativ diejenigen Bereiche einzubeziehen, die vom Verbraucher verzehrt werden. Das entnommene Material wurde im sterilen Stomacherbeutel mit Filtereinsatz 1:1 mit sterilem Peptonwasser aufgefüllt und für eine Minute bei mittlerer Geschwindigkeit im Stomacher homogenisiert.

Von der im Stomacherbeutel filtrierten Mischung aus Material und Peptonwasser wurden 10 ml in die Anreicherungsbouillon verbracht und diese bei 30°C für 48 h aerob inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde in jedem Versuchsansatz ein *Arcobacter butzleri* Stamm der DSMZ mitgeführt.

Aus der inkubierten Anreicherung wurde 1 cm unter der Oberfläche Material entnommen, weil aufgrund der Mikroaerophilie des Keimes von JOHNSON und MURANO (1999) dieses Vorgehen und kein Homogenisieren der Anreicherung vorgeschlagen worden war. Für die Entnahme wurde eine 10 µl-Impföse eingesetzt, mit der dann im fraktionierten Ausstrich der Übertrag auf das Plattenmedium erfolgte, wobei aus jeder Anreicherung 2 Platten angesetzt wurden. Die Bebrütung dauerte 48 Stunden mikroaerob bei 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Das mikroaerobe Milieu wurde geschaffen, indem die Platten im Anaerobiertopf unter Einsatz von Campy Kit (Oxoid) gelagert wurden.

3.1.3 Isolierung, Differenzierung und Auswertung

Makroskopische Untersuchung

Auf dem JM-Plattenmedium stellen sich *Arcobacter*-verdächtige Kolonien wie folgt dar:

- rund, mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1 mm (in einzelnen Fällen maximal 2 mm)
- semitransluzent bis blass beigefarben
- glatt und
- erhaben.

Kolonien mit dieser Morphologie wurden zunächst biochemisch, dann mittels Gram-Färbung und hinsichtlich ihrer Beweglichkeit überprüft.

Biochemische Differenzierung von *Arcobacter* spp.

Katalase-Test

In sauerstoffhaltiger Atmosphäre bilden sich in der Bakterienzelle toxische Sauerstoffmetaboliten. Viele Mikroorganismen besitzen aber Enzyme, um derartige Substanzen zu zerstören. Das am weitesten verbreitete Ferment dieser Kategorie ist die Katalase, die Wasserstoffperoxyd spaltet. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten, wobei im ersten Sauerstoff entsteht ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Katalase (red.)} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Katalase (ox.)}$) und im zweiten Sauerstoff plus Wasser ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Katalase (ox.)} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{Katalase (red.)}$) gebildet wird. Die Summengleichung lautet demnach: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Zur Prüfung der Katalaseaktivität wurde mit der Impföse das Kolonienmaterial entnommen und auf einem Objektträger mit 3 Tropfen einer 3 %igen Wasserstoffperoxydlösung (Merck, Darmstadt) vermischt. Blasenbildung zeigt eine positive Reaktion an. Dabei ist die schwache bis fehlende Ausprägung der Katalase Aktivität bei *Arcobacter butzleri* zu beachten.

Oxidase-Nachweis

Die Cytochromoxidase oxidiert das reduzierte Cytochrom c und wird dabei selbst in die reduzierte und inaktive Form überführt. Durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff geht die reduzierte Cytochromoxidase wieder in die aktive Form über. In Anwesenheit molekularen Sauerstoffs kann das Cytochromoxidase / Cytochrom c-System das NaDi-Reagenz (1-Naphthol-Dimethylparaphenylendiamin) unter Bildung des Kondensationsmoleküls Indophenolblau reduzieren. Diese Reaktion wird zur Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien verwendet. Der BactidentTM-Kit enthält auf einem Papierstreifen eine markierte Reaktionszone, auf die eine einzeln liegende Kolonie, die vom Nährboden mit einer Impföse entnommen wurde, aufgebracht wird. Bei Cytochromoxidase-positiven Bakterien färbt sich die Reaktionszone innerhalb von 10-30 Sekunden blau bis blauviolett. Dieser Nachweis wurde als ausschlaggebendes Kriterium für die Einstufung als *Arcobacter*-positive Kolonie verwendet, da alle *Arcobacter* Spezies in diesem Test positiv reagieren.

Indoxylacetat-Hydrolyse

Im menschlichen Verdauungstrakt entsteht Indoxyl beim bakteriellen Abbau von Tryptophan. Für die Identifizierung kann man sich diese Fähigkeit des Bakteriums zunutze machen. Aus Indoxyl entsteht bei Anwesenheit von Luft Indigo, was durch eine blaue Verfärbung sichtbar wird.

In dem Test wurde auf ein mit Indoxylacetat beschicktes Filterpapierplättchen mit einer Öse Bakterienmaterial gebracht und eingerieben sowie ein Tropfen steriles Aqua dest. zugegeben. Nach 10 - 30 Minuten wird bei positiver Reaktion eine Blaufärbung sichtbar (POPVIC-UROIC, 1990).

Mikroskopische Untersuchung

Kolonien mit charakteristisch positiven Reaktionen wurden einer Gram-Färbung unterzogen.

Gramfärbung

Zunächst wurde der luftgetrocknete, hitzefixierte Ausstrich aus Koloniematerial mit Kristallviolett gefärbt (Merck, Darmstadt) (3 min.), dann erfolgte nach Abgießen der Farbe das Beizen mit Jod-Jodkalium-Lösung (Lugol: 2 min.). Nach Abspülen der Lösung schloss sich die Entfärbung mit Ethanol (96%) an (ca. 1 min.). Der Alkohol wurde mit Wasser entfernt. Die Gegenfärbung der entfärbten Bakterien erfolgte mit Safranin (1 min). Grampositive Bakterien behalten den zuerst aufgebrauchten violetten Farbstoff (Kristallviolett) trotz der Alkohol-Entfärbung und sind daher violett gefärbt. Die Gram-negativen Bakterien werden bei Behandlung mit Lugol-Lösung (Merck, Darmstadt) und Ethanol entfärbt und können dann mit dem roten Farbstoff (Safranin) erneut gefärbt werden. Die Ursache dieses unterschiedlichen Färbeverhaltens liegt im Aufbau der bakteriellen Zellwände begründet, d. h. die Zellwand gram-negativer Keime besteht aus einer ein- statt mehrschichtigen Mureinhülle und enthält keine Teichonsäure. Unter dem Lichtmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung (Ölimmersion) erscheinen gram-positive Keime blau bis dunkelviolet, gram-negative hellrot. *Arcobacter* spp. zeigen sich als kleine, gramnegative, kommaförmige bzw. gebogene Stäbchen.

Test auf Beweglichkeit

Nach Überimpfung in BHI-Bouillon und 48-stündiger, aerober Inkubation bei 30°C wurde die Beweglichkeit im hängenden Tropfen geprüft.

Die beimpfte BHI-Bouillon wurde auf dem Whirl-Mixer durchmischt und dann ein Tropfen daraus mit einer sterilen Impföse auf ein Deckgläschen aufgebracht. Fixiert durch Vaseline, wurde das Deckgläschen in die Wölbung eines Hohlschliffobjektträgers gehangen; somit konnte unter dem Mikroskop die Beweglichkeit der Keime im hängenden Tropfen überprüft werden. Typische Bewegungsmodi der *Arcobacter* sind v. a. schnelles, zickzack-förmiges

Flitzen, auch „darting“ genannt, aber auch korkenzieherförmiges Drehen um sich selbst („Trudeln“) sowie das „Zappeln“, wobei nur ein Ende des Keims hin- und herpeitscht.

3.1.4 Standardkeimprofil des institutseigenen Routinelabors

Das Standardkeimprofil des Routinelabors umfasste den quantitativen Nachweis von 17 verschiedene Bakteriengruppen und –spezies sowie die qualitative Untersuchung auf Salmonellen. Die quantitativen Erhebungen erfolgten mittels des Drop-Plating-Verfahrens:

25 g der Probe wurden steril entnommen, 1:10 mit gepufferten 1%igen Peptonwasser (PW) verdünnt und im Stomacher homogenisiert. Aus dieser Erstverdünnung wurde 1 ml entnommen und in 9 ml PW überführt, auf dem Whirl Mixer gemischt und wiederum 1 ml daraus in 9 ml PW überführt. Auf diese Weise wurde eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5} erstellt.

Die zu beimpfenden Agarplatten wurden in fünf Sektoren unterteilt und mit 0,05 ml des Probenansatzes und der Verdünnungsstufen beimpft (Tropfplattenverfahren / Drop-Plating). Nach dem Trocknen der Platten wurden diese inkubiert, jeweils entsprechend der spezifischen Anforderungen des gemäß der Plattenart gesuchten Keimes. Es handelte sich um folgende Keime bzw. Keimgruppen: *Bacillus cereus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, Hefen und Schimmelpilze (verwendete Medien s. Anhang).

Der qualitative Nachweis (Presence-Absence-Test) auf Salmonellen erfolgte über eine Voranreicherung, Anreicherung und anschließenden Ausstrich auf Selektivmedien. Die Voranreicherung bildet der Probenansatz mit dem gepufferten Peptonwasser im Stomacherbeutel. Dieser wurde 24 Stunden aerob bei 37°C inkubiert. Material hieraus wurde in die Anreicherungslösungen Rappaport-Vassiliadis-Bouillon (Inkubation 24 h, aerob bei 42°C) und Selenit-Cystein-Medium (Inkubation 24 h, aerob bei 37°C) übertragen. Anschließend wurden aus der so angereicherten Probe Ausstriche auf XLD (Xylose-Lysin-Desoxycholat-Medium) und modifiziertem BPLS (Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Agar) gefertigt, die für wiederum 24 Stunden bei 37°C aerob bebrütet wurden. Präsumptive Salmonellen-Kolonien wurden biochemisch und serologisch bestätigt.

3.2 PCR-Nachweis

3.2.1 Reaktionsansatz und Amplifikation

Der molekularbiologische Nachweis der *Arcobacter* spp. erfolgte mittels Multiplex-Polymerasekettenreaktion (mPCR). In der vorliegenden Studie wurde die Methode von HARMON und WESLEY (1997) für den simultanen Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* verwendet. Es handelt sich um eine Multiplex-PCR mit dem Primer Set I, der ein 1223 bp Amplifikat erzeugt. Dieses ist genus-spezifisch für alle drei interessierenden *Arcobacter* spp., d.h. für *Arcobacter butzleri*, *cryaerophilus* und *skirrowii* (HARMON und WESLEY 1997). Primer Set II bedingt ein für *Arcobacter butzleri* spezifisches 686 bp Amplifikat (BASTYNS et al. 1995) (Tabelle 4).

Tabelle 5: Primer Sets für die Multiplex-PCR

SET	ZIEL-NUKLEOTIDE	SPEZIES	AMPLIFIKAT GRÖÙE (BP)	PRIMER	NUKLEOTIDSEQUENZ (5' → 3')
I	16S rRNA Gen (HARMON & WESLEY, 1996)	<i>A. butzleri</i>	1223	Arco I	AGA GAT TAG CCT GTA TTG TAT C
		<i>A. cryaerophilus</i>	1223	Arco II	TAG CAT CCC CGC TTC GAA TGA
		<i>A. skirrowii</i>	1223		
II	23S rRNA Gen (BASTYNS et al. 1995)	<i>A. butzleri</i>	686	ARCO 2 BUTZ	TTC GCT TGC GCT GAC AT CTA TTC AGC GTA GAA GAT G

Materialien und Geräte

- DNeasy™ Tissue Kit Qiagen
- Thermomixer Eppendorf
- Thermocycler BIO-RAD, iCycler iQTM
- UV-Transilluminator Alpha Innotech, Alphamager
- Zentrifuge Eppendorf

DNA Extraktion

Die Probenaufbereitung für den PCR-Nachweis nach HARMON und WESLEY (1997) erfolgte unter Verwendung des DNeasyTM Tissue Kit von Quiagen gemäß des Herstellerprotokolls.

Das Kit arbeitet auf der Basis einer Silica-Gel-Membran-Technik, die eine effiziente Aufreinigung von zellulärer DNA gestattet, da eine Zellyse mit unmittelbar anschließender DNA Bindung an die Membran stattfindet. Die Lyse erfolgt durch Proteinase K, die Ausfällung der Nucleinsäuren geschieht durch 96%iges Ethanol und die anschließende Extraktion der DNA durch die Bindung an die Membran. Es schlossen sich Waschschriffe mit verschiedenen Pufferlösungen an, wodurch Verunreinigungen entfernt wurden.

Polymerasekettenreaktion (PCR – englisch: Polymerase Chain Reaction)

Kleine, aber genau definierte DNA-Abschnitte können molekularbiologisch gezielt mittels der sogenannten PCR vervielfältigt (amplifiziert) werden. Hierbei wird im ersten Schritt die doppelsträngige DNA bei 94°C in die zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Danach binden bei 59°C Startermoleküle (Primer) an die DNA. Ein hitzestabiles Enzym, die DNA-Polymerase, verlängert den Primer durch Anlagerung von Nukleotiden, wobei der vorhandene Einzelstrang als Vorlage dient und zu Doppelsträngen ergänzt wird.

Da die Reaktionsprodukte eines Zyklus jeweils das Ausgangsmaterial des nächsten Zyklus bilden, kann im Optimalfall die DNA-Zielsequenz exponentiell repliziert werden, woraus sich die Bezeichnung „Kettenreaktion“ ableitet.

Reaktionsansatz

Für eine PCR-Reaktion sind folgende Bestandteile erforderlich:

- magnesiumhaltiger Puffer
- die vier Desoxy-Nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP im Überschuss
- die DNA-Polymerase
- die Primer

Die Amplifikation erfolgte an gereinigter DNA in einem 25µl-Reaktionsgemisch, welches in der Tabelle 6 angegeben ist.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Amplifizierung

	KONZENTRATION	VOLUMEN JE ANSATZ (μL)
10fach PCR-Puffer, F 510	1fach	1,56
50 mM MgCl_2 , F 510MG	3,5 mM	1,75
dNTP-Mix; F-560L	200 μM	0,5
Primer Arco I	0,025 μM	0,25
Primer Arco II	0,025 μM	0,25
Primer Arco 2	0,025 μM	0,25
Primer BUTZ	0,025 μM	0,25
Polymerase DyNAzyme; F501L	1,25 U	0,31
Template DNA	2,0 ng	2
Aqua bidest., steril	ad 25 μl	17,88
Gesamt		25,0

Zur Amplifikation wurden zunächst die für die Reaktion erforderlichen Komponenten (mit Ausnahme der zu beprobenden DNA) im sogenannten Mastermix zusammengeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Zugabe der Template DNA (Proben-DNA) in einem Ansatz von je 25 μl in Minitubes pipettiert. Dabei handelte es sich um dicht schließende Reaktionsgefäße, die keine Verdunstung zulassen. Die Minitubes wurden in einen DNA-Thermocycler verbracht, der einen automatisierten Ablauf der PCR ermöglichte, indem die Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für die jeweilige Reaktion benötigt wurde, erhitzt oder abkühlt wurden. Um eine Kondensatbildung im Deckel des Reaktionsgefäßes zu verhindern, wurde der Cyclederdeckel auf 100°C vorgeheizt. Die Template DNA wurde einer initialen Denaturierung bei 94°C für 1 min. unterzogen. Der PCR-Prozess umfasste eine Anzahl von 40 Amplifikationszyklen.

Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten:

1. *Denaturierung*: zunächst wurde die doppelsträngige DNA für 1 min auf 94°C erhitzt, um die Stränge zu trennen.
2. *Primer annealing*: die Temperatur wurde für ca. 60 sec. bei 59°C gehalten, um die temperaturabhängige, spezifische Anlagerung der Primer an die entsprechenden Komplementärstränge zu ermöglichen.
3. *Elongation (Primer extension)*: die DNA-Polymerase füllt die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer bildet den Anfang des neuen Einzelstranges. Die optimale Temperatur liegt bei 72°C. Verwendet wurde die hitzestabile Taq-Polymerase. Dieser Schritt dauerte etwa 1 min.

Zur Überprüfung der Reaktion wurden immer Positivkontrollen (*A. butzleri*, DSMZ) und eine Negativkontrolle (Aqua destillata) mitgeführt. Für den PCR-Durchlauf wurde der Thermocycler wie folgt programmiert:

- Zyklus 1:	Initiale Denaturierung	
Step 1:	94°C	4 min
- Zyklus 2: (39 x)	Amplifikation (Denaturierung/Annealing/Elongation)	
Step 1:	94°C	60 sec
Step 2:	56°C	60 sec
Step 3:	72°C	60 sec
- Zyklus 3:	abschließende Elongation	
Step 1:	72°C	7 min
- Zyklus 4:	Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung	
Step 1:	4°C	(∞)

3.2.2 Analyse der Amplifikate

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über eine horizontale Gelelektrophorese auf Agarosegelen. Dabei wurden die Produkte nach Anlegen einer Spannung anhand ihrer Größe elektrophoretisch getrennt. In der vorliegenden Studie wurden 1,5 %ige Agarose Gele verwendet. Ihre Herstellung erfolgte auf der Basis von TBE-Puffer, aus 10fach konzentrierter Tris-Borat-EDTA Stammlösung, verdünnt mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10. Für ein kleines Gel wurden 2,25 g Agarose in 150 ml 1xTBE-Puffer suspendiert, für ein großes Gel 4,5 g Agarose in 300 ml 1xTBE-Puffer. Die Agarose wurde durch Kochen im Dampftopf vollständig gelöst, auf unter 60°C abgekühlt, verdampftes Wasser ergänzt und mit 7,5 µl bzw. 15 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Abschließend wurde die Lösung auf den Gelträger gegossen, der Probenkamm eingesetzt und das Gel durch Abkühlen verfestigt. Nun wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer verbracht. Der Laufpuffer darin bestand aus 1850 ml incl. 92,5 µl Ethidiumbromid bzw. 1700 ml incl. 85 µl 1 x TBE-Puffer.

Von den Amplifikaten wurden 10 µl mit 2 µl Geltaschenpuffer vermischt, von dieser Mischung dienten je 10 µl der Beschickung der Slots (Aussparungen des Probenkammes). Zum Größenvergleich der Basenpaare wurde der DNA-Größenmarker (Längenstandard: pBR328 Mix I) mitgeführt sowie eine Positiv-, eine Negativkontrolle und ein Leerwert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde bei einer Spannung von 120 V.

Der verwendete Marker pBR 328 Mix I kam den gesuchten Banden von 1223 und 686 bp recht nahe, wie die Positivkontrolle zeigt (Abbildung 2), so dass ein Abgleich zum Nachweis von *Arcobacter*-positiven Proben möglich war. Die im elektrischen Feld aufgetrennten PCR-Produkte wurden anschließend im Transilluminator unter UV₃₁₂-Licht als Banden sichtbar gemacht und mittels Fotografie dokumentiert.

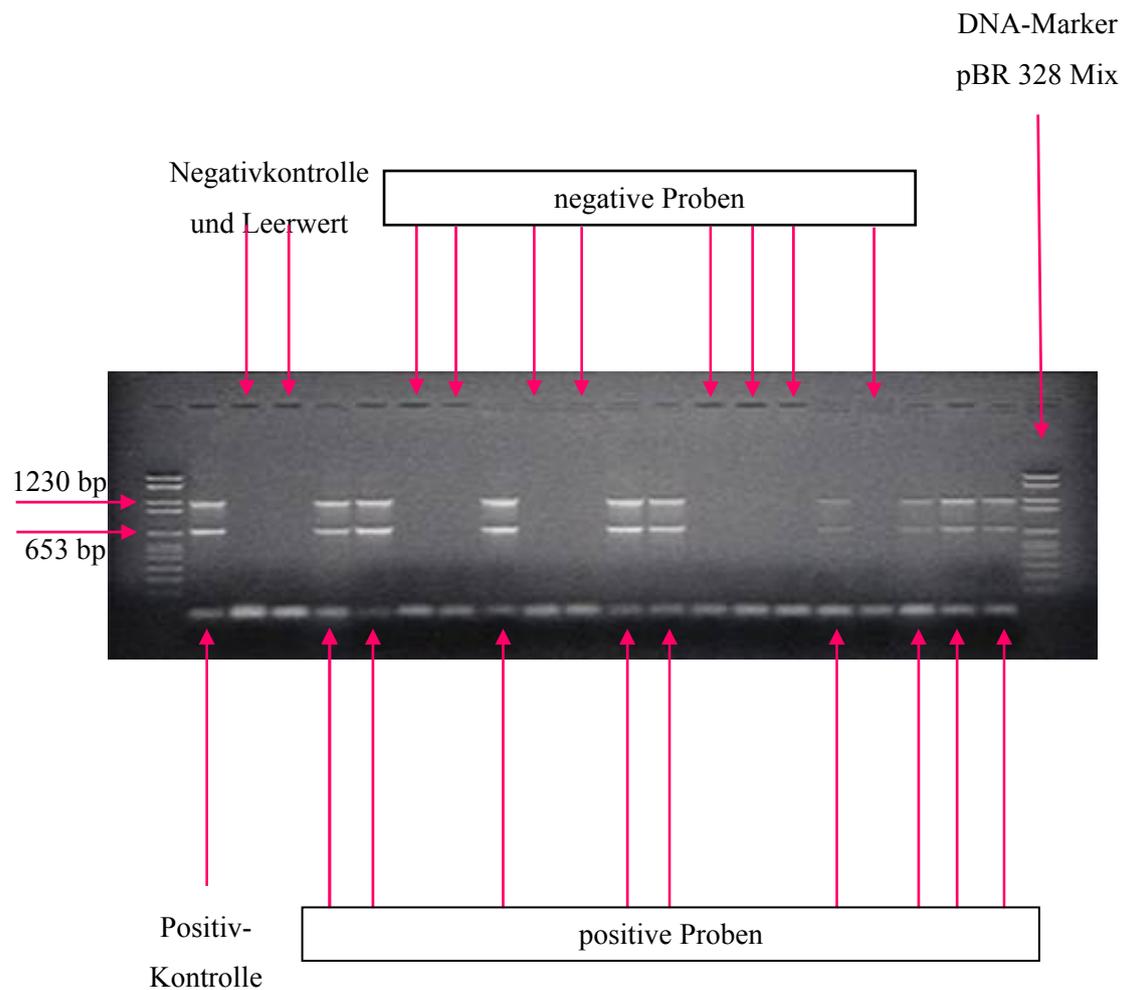


Abbildung 2: Schema der PCR-Gelelektrophorese

3.3 Übersicht Vorversuche - Hauptversuch

Die 6 Vorversuche sowie der Hauptversuch sind in Tabelle 7 synoptisch dargestellt. Ab Vorversuch V wurde die Prävalenz von *Arcobacter* spp. in Hähnchenfleisch und Rinderhackfleisch ermittelt, wobei sich die drei Teilprojekte analysentechnisch wie folgt unterscheiden: Zunächst wurde die PCR-Analyse unmittelbar aus der Anreicherungsbouillon vorgenommen, im Weiteren lediglich als Bestätigung für *Arcobacter*-verdächtige Kolonien eingesetzt. Das heißt, in Vorversuch V wurden Proben von Hähnchenschenkel und Rinderhackfleisch in die JM-Anreicherungsbouillon verbracht, daraus erfolgte die PCR und der kulturelle Nachweis. Parallel wurden mit den Referenzstämmen beimpfte Proben mitgeführt. Darüber hinaus wurden bei Vorversuch VI verdächtige Kolonien des kulturellen Nachweises via PCR überprüft. Im Hauptversuch wurde das Probenmaterial in der JM-Bouillon angereichert, daraus in die PCR überführt sowie auf dem JM-Plattenmedium

kultiviert, präsumptive *Arcobacter*-Kolonien wurden ebenfalls mittels PCR-Verfahren bestätigt.

Tabelle 7: Übersicht Vorversuche - Hauptversuch

Versuchsteil	Inhalt des Versuchs	Proben
Vorversuch I	Anzucht der Referenzstämme Erprobung der JM-Medien Andere Keime auf JM-Medien <i>Arcobacter</i> auf neutralen Medien Biochemische Tests: Oxidase/Katalase/IAH	
Vorversuch II	Gesamtstatus der zu untersuchenden Lebensmittel Wiederfindung von <i>Arcobacter</i> nach Beimpfung	
Vorversuch III	Anzucht von <i>Arcobacter</i> spp. gemäß <i>Campylobacter</i> Isolierungsverfahren	
Vorversuch IV	Etablierung der molekularbiologischen Untersuchung	
Vorversuch V	Kultureller Nachweis und PCR: Probenahme sowie Beimpfen von Hähnchenfleisch Teilproben mit den Referenzstämmen → JM-Anreicherungsbouillon → hieraus PCR und kultureller Nachweis	Probenanzahl: 15 x Hähnchenschenkel 11 x Rinderhackfleisch plus 16 x beimpftes Hähnchenfleisch
Vorversuch VI	Kultureller Nachweis und PCR: Probenahme → JM-Anreicherungsbouillon → hieraus PCR und kultureller Nachweis → Bestätigung verdächtiger Kolonien via PCR	Probenanzahl: 39 x Hähnchenschenkel 38 x Rinderhackfleisch
Hauptversuch	Kultureller Nachweis und PCR: Probenahme → JM-Anreicherungsbouillon → hieraus kultureller Nachweis und PCR → Bestätigung verdächtiger Kolonien via PCR	Probenanzahl: 25 x Hähnchenschenkel, Tiere aus ökologischer Haltung 25 x Hähnchenschenkel, Tiere aus konventioneller Haltung 25 x Rinderhackfleisch

Der exakte Versuchsablauf ist für den Vorversuch V sowie den Hauptversuch jeweils als Fließschema (Abb. 3 und 4) dargestellt.

Fließschema - Versuchsaufbau Vorversuch V und Modifikation Vorversuch VI

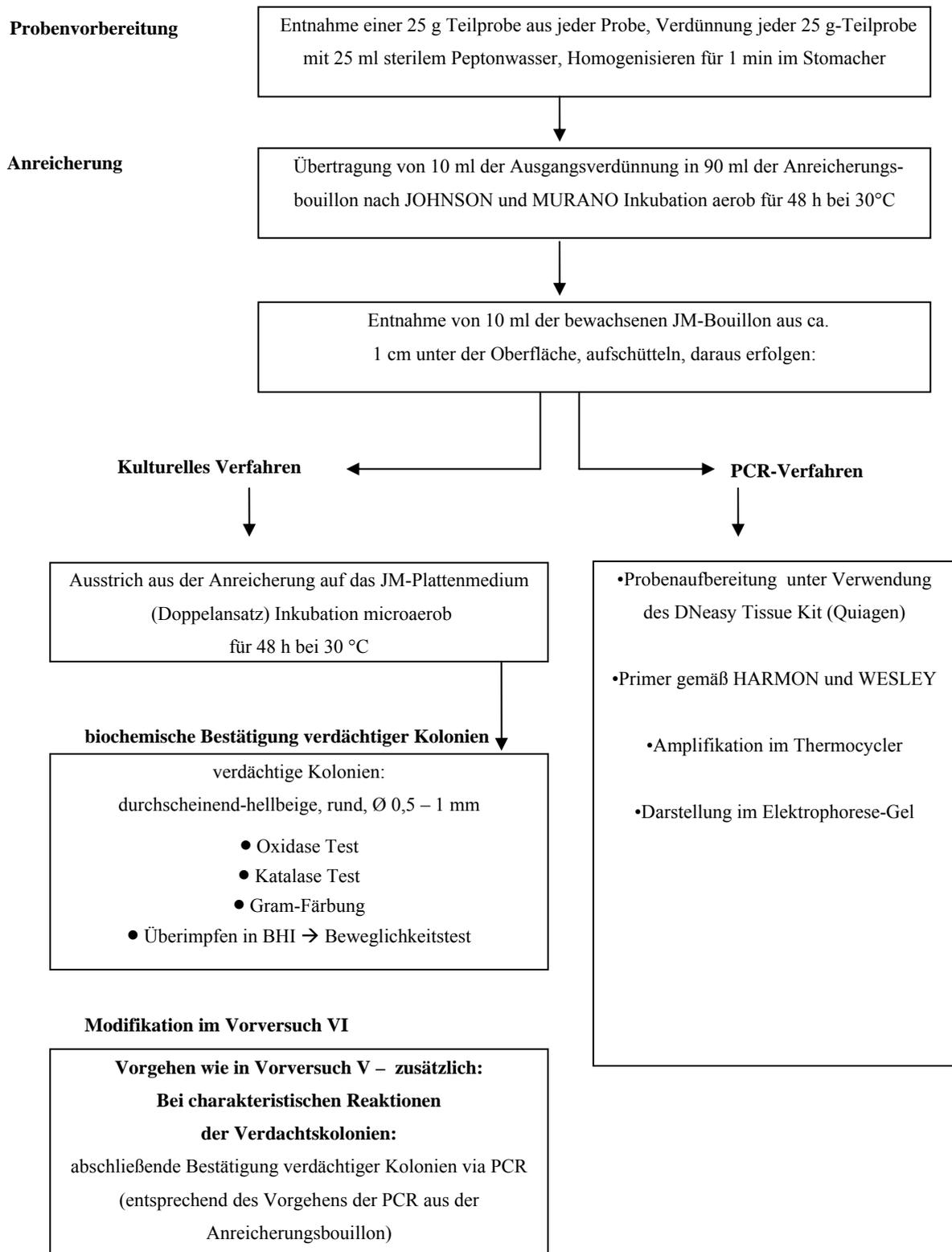


Abbildung 3: Fließschema Vorversuch V und VI

Fließschema – Versuchsaufbau

Hauptversuch

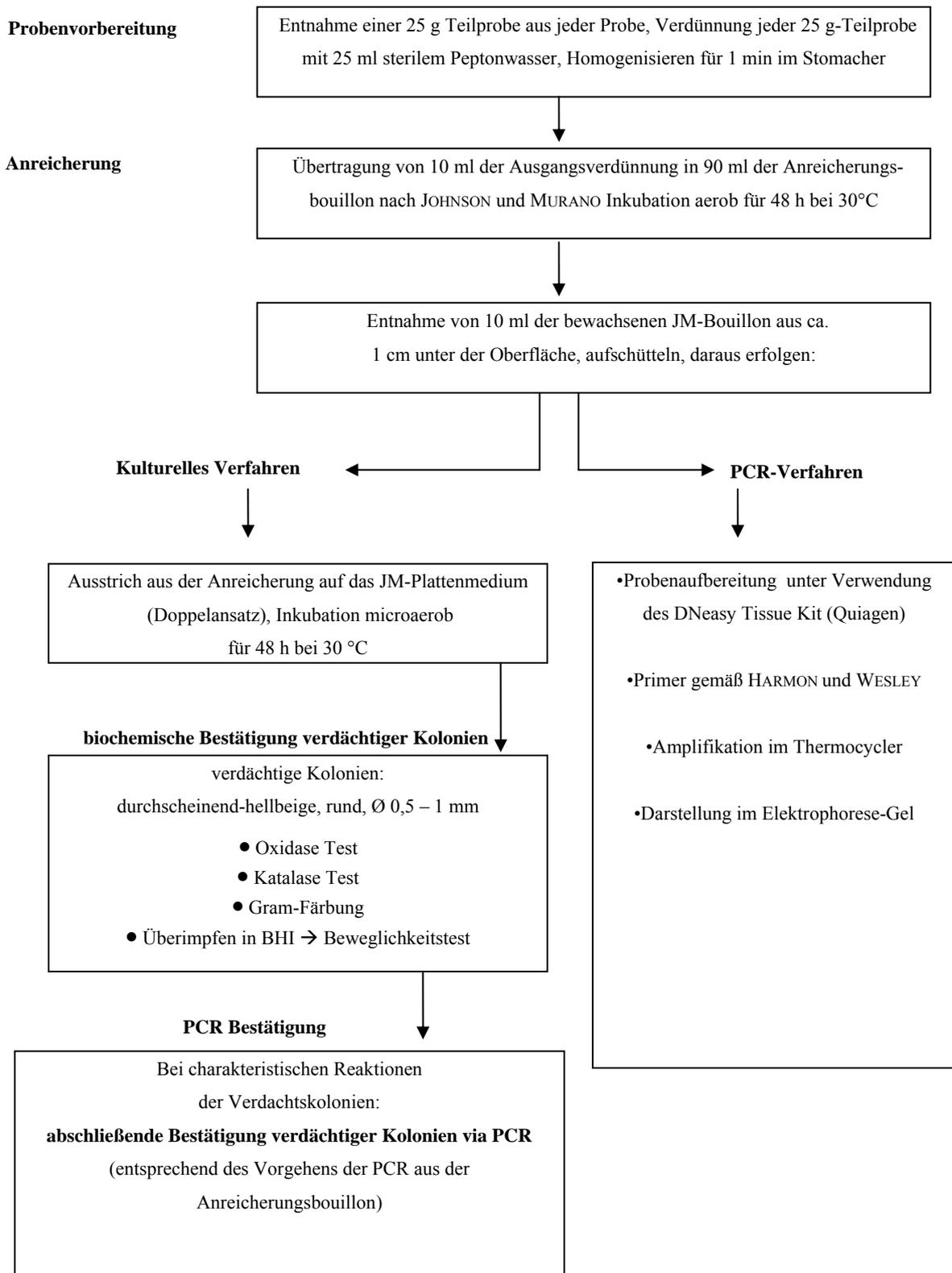


Abbildung 4: Fließschema Hauptversuch

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorversuche zur Optimierung der Methoden

4.1.1 Vorversuch I: Referenzstämmen

In einem ersten Vorversuch wurden die 5 *Arcobacter*-Referenzstämmen (siehe Kapitel 3.1.1) angezüchtet und das geplante kulturelle Verfahren hinsichtlich der Anzucht von *Arcobacter* spp. sowie der Selektivität erprobt, indem sie zusammen mit Keimen aus der Mikroorganismen-Stammsammlung des Routinelabors des Institutes für Lebensmittelhygiene beimpft wurden. Weiterhin wurde das Kultivierungsverhalten von *Arcobacter* spp. auf neutralen Medien sowie die Durchführung der biochemischen Tests, Gram-Färbung und Beweglichkeitsprüfung im hängenden Tropfen überprüft.

Anzucht von *Arcobacter* spp. auf JM-Medien: Die gefriergetrockneten *Arcobacter*-DSMZ Stämme wurden gemäß Anweisung in BHI-Bouillon rehydriert und angezüchtet. Bereits hier zeigte sich, dass die in der Literatur häufig verwendete Beschreibung „fastidious“ („heikel“) das Wachstumsverhalten korrekt wiedergibt. Abgesehen von den zwei *Arcobacter butzleri* Stämmen bedurfte es auch in unseren Versuchen mehrere Anläufe, bis ein souveränes Wachstum erzielt werden konnte. Souverän in diesem Zusammenhang meint ein reproduzierbares Wachstumsverhalten, bei dem eine angemessene Anzahl von Kolonien entstanden, die eine Auswertung möglich machten.

Arcobacter skirrowii musste letztendlich erneut bei der DSMZ bestellt werden und wurde zur Rehydrierung in BHI-Bouillon mit 5 % Schafblutzusatz verbracht, wie es für die amerikanischen Referenzstämmen empfohlen wird. Erst danach ließ sich eine deutliche Koloniebildung erzielen.

Wie im Kapitel 3.1.3 beschrieben, stellten sich die *Arcobacter*-Kolonien auf dem JM-Plattenmedium rund, im Durchmesser 0,5 bis 1 mm groß, semitransluzent bis blass beigefarben, glatt und erhaben dar. Bei microaerober Anzucht waren die Kolonien regelmäßig etwas kleiner als im aeroben Milieu. Stets ein üppiges Wachstum (viele, relativ große Kolonien) konnte bei den *Arcobacter butzleri* Stämmen beobachtet werden, oftmals sehr spärlich (wenige, kleine Kolonien) zeigte sich die Koloniebildung von *A. cryaerophilus*, v. a. aber von *A. skirrowii*. Eine Besonderheit bildete die Koloniemorphologie von *A. nitrofigilis*, da sich die Kolonien nicht nur erhaben, sondern deutlich kugelig, perlenähnlich und hellgrau darstellten.

Folgende Mikroorganismen der instituseigenen Stammsammlung wurden auf JM-Medien angezüchtet: *Bacillus cereus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, Hefen und Schimmelpilze.

Nach Beimpfung der JM-Anreicherungsbouillon und anschließender 48-stündiger aerober Inkubation bei 30°C erfolgte der Übertrag auf das JM-Plattenmedium mittels Verdünnungsausstrich. Wachstum zeigten *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*, Schimmelpilze und Hefen, die sich jedoch alle in der Gramfärbung abgrenzen ließen. Problematischer war die ausgeprägte Koloniebildung von *Pseudomonas aeruginosa*, da sich die Keime ebenfalls gram-negativ, Oxidase- und Katalase-positiv verhalten. Pseudomonaden sind jedoch obligat aerob, weshalb im späteren Versuchsvorgehen die Inkubation der Plattenmedien microaerob erfolgte, um ihre Vermehrung einzuschränken.

Anzucht von *Arcobacter* spp. auf neutralen Medien

Da die biochemischen Tests möglichst von neutralen, nicht selektiven Nährmedien durchgeführt werden, kamen für die Anzucht von *Arcobacter* spp. Plate Count Agar (PC), Nähragar (NA) und ISO Agar, die in der Routinediagnostik des Instituts zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl bzw. Vorbereitung von weiteren Tests dienen, zur Anwendung.

Die Versuche bestätigten das gute Wachstum von *A. butzleri* I, DSM Nr. 8739. Während die übrigen Stämme auf PC keine sichtbare Vermehrung zeigten, konnte hier noch ein deutliches Koloniewachstum von *A. butzleri* beobachtet werden (Tabelle 8). Das Wachstumsverhalten von *A. nitrofigilis* blieb unberücksichtigt, da dieser für Erkrankungsgeschehen keine Rolle spielt. Die anderen Stämme erbrachten insgesamt eine spärliche Kolonieentwicklung, überwiegend nur stecknadelspitzgroß, so dass weitere Tests nur schwerlich möglich waren.

Tabelle 8: Anzucht von *Arcobacter* auf neutralen Medien

Stamm	Koloniemorphologie auf Plate Count	Koloniemorphologie auf NA	Koloniemorphologie auf ISO
<i>A. butzleri</i> , DSM – Nr. 8739	mäßiges Wachstum, stecknadelspitz-groß, durchsichtig, rund, glänzend	üppiges* Wachstum, Ø 1 mm, rund, hellbeige, glänzend	üppiges* Wachstum Ø 1 bis 1,5 mm, gelb- beige, rund, glänzend
<i>A. butzleri</i> , DSM – Nr. 7301	kein Wachstum	mäßiges Wachstum, stecknadelspitz-groß, rund, durchsichtig, glänzend	mäßiges Wachstum, stecknadelspitz-groß, durchsichtig, rund, glänzend
<i>A. cryaerophilus</i>	kein Wachstum	Rasenvachstum, aber winzige Kolonien: maximal stecknadelspitz-groß, rund, durchsichtig, matt	mäßiges Wachstum, stecknadelspitz-groß, durchsichtig, rund, glänzend
<i>A. skirrowii</i>	kein Wachstum	üppiges Wachstum, Ø 1 mm, rund, hellgrau	mäßiges Wachstum, Ø 1 mm, rund, glänzend, durchsichtig
<i>A. nitrofigilis</i>	üppiges Wachstum, hellgraue, runde, erhabene Kolonien, Ø 1 mm	üppiges Wachstum, stecknadelspitz-groß, rund, erhaben, hellgrau	üppiges Wachstum, stecknadelspitzgroße, gelb-graue, erhabene Kolonien

* üppig: Wachstum auf allen drei Fraktionen des Verdünnungsausstrichs

A. skirrowii bildete zwar bei dieser Beimpfung Kolonien von 1 mm Durchmesser, bei seinem insgesamt wechselhaften Wachstumsverhalten ist jedoch nicht davon auszugehen, dass dieser Befund unter Einfluss von der Konkurrenzflora aus den Lebensmittelproben reproduzierbar bleibt. Daher wurden im weiteren Versuchsvorgehen die biochemischen Tests von den Selektivmedien durchgeführt.

Differenzierung der *Arcobacter*-Stämme

In der biochemischen Untersuchung mit dem Katalase- und Oxidase-Test ergaben alle fünf *Arcobacter*-Referenzstämme positive Nachweise. Dabei fiel auf, dass *A. cryaerophilus* zwar

die kleineren Kolonien (< 1 mm), jedoch die stärksten Katalasereaktionen zeigte. Die schwächste Blasenbildung im Katalasetest fand sich bei den zwei *A. butzleri* Stämmen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Biochemische Differenzierung der Referenzstämmen

	Oxidase	Katalase
<i>A. butzleri</i> DSM – Nr. 8739	positiv, deutlich Färbung	positiv, sehr schwache Bläschenbildung
<i>A. butzleri</i> DSM – Nr. 7301	positiv, deutlich Färbung	positiv, sehr schwache Bläschenbildung
<i>A. cryaerophilus</i>	positiv	positiv, kräftige Blasenbildung
<i>A. skirowii</i>	positiv, schwache Färbung	positiv, starke Bläschenbildung
<i>A. nitrofigilis</i>	positiv, schwache Färbung	positiv, aber schwache Bläschenbildung

Tabelle 10: Gramfärbung der Referenzstämmen und Keimmorphologie

	Gramfärbung und Keimmorphologie
<i>A. butzleri</i> DSM – Nr. 8739	gramnegative Stäbchen, schlank
<i>A. butzleri</i> DSM – Nr. 7301	gramnegative Stäbchen, schlank
<i>A. cryaerophilus</i>	gramnegative Stäbchen, geringgradig kürzer, plumper und gebogener als <i>A. butzleri</i>
<i>A. skirowii</i>	gramnegative Stäbchen, geringgradig kürzer, plumper und gebogener als <i>A. butzleri</i>
<i>A. nitrofigilis</i>	gramnegative Stäbchen, sehr lang, sehr schlank

Die Gramfärbung ergab stets gramnegative, schlanke Stäbchen, die unterschiedlich stark gebogen waren.

Weiterhin wurde der Indoxylacetat-Hydrolyse Test mit den *Arcobacter*-Referenzstämmen sowie den Mikroorganismen der Stammsammlung des Routinelabors des Institutes durchgeführt. Da diverse Nicht-*Arcobacter*-Keime ebenfalls positiv reagierten, erscheint der Test als Abgrenzungskriterium zwischen *Arcobacter* spp. und anderen Mikroorganismen ungeeignet zu sein und wurde nicht weiter in den Versuchsablauf integriert.

Beweglichkeitstest im Hängenden Tropfen

Nach Anzucht in JM-Anreicherungsbouillon, BHI-Bouillon mit Schafblut Zusatz und purer BHI-Bouillon wurde die Beweglichkeit von *Arcobacter* spp. überprüft. In der JM-Anreicherung stellte sich eine sehr hohe Keimdichte ein, weshalb keine Bewegung der einzelnen Bakterien entstand, sondern eine „Haufenbewegung“. Darüber hinaus verhinderte die Eigenfarbe der Bouillon eine ausreichend scharfe Sicht. Der Schafblutzusatz in der BHI-Bouillon schäumt beim Aufquirlen der Bouillon zu sehr auf, während sich in der reinen BHI die Bewegung gut erkennen ließ. Das charakteristische, in der Literatur beschriebene „Darting“, also eine schnelle, zick-zackförmige Vorwärtsbewegung, war zu erkennen, darüber hinaus aber auch korkenzieherförmiges Drehen um sich selbst („Trudeln“) sowie das „Zappeln“, wobei nur ein Ende des Keims hin- und herpeitscht.

4.1.2 Vorversuch II: Gesamtstatus und Wiederfindungsrate

Im zweiten Teil der Vorversuche wurden die zu untersuchenden Lebensmittel hinsichtlich ihres Gesamtkeimgehaltes untersucht sowie mit *Arcobacter* spp. beimpft, um die Wiederfindungsrate zu ermitteln.

Gesamtstatus

Für den menschlichen Verzehr und den Verderb von Fleisch sind in erster Linie die mesophilen (optimales Wachstum zwischen 30 und 40°C) und thermophilen (optimales Wachstum zwischen 40 und 50°C) schnell wachsenden Keime relevant (REUTER, 2003). In den vorliegenden Erhebungen wurden drei Rindfleisch- und Hähnchenschenkelproben auf 17 verschiedene Bakteriengruppen und –spezies quantitativ und auf Salmonellen qualitativ untersucht. Die Ergebnisse, angegeben als Mittelwert, finden sich in Tabelle 11.

Die gleichen Proben wurden zwei weiteren Untersuchungen unterzogen: Zum einen wurde eine Teilprobe im kulturellen Verfahren nach JOHNSON und MURANO analysiert (1999), um eine natürliche Kontamination mit *Arcobacter* spp. abzuklären (Tabelle 12). Zum anderen wurde je eine Probe Rinderhackfleisch und Hähnchenschenkel mit einer *Arcobacter*

Suspension beimpft, deren Keimgehalt vorab via Drop-Plating Verfahren ermittelt worden war, um auf diese Weise die Wiederfindungsrate festzustellen (Tabelle 13).

Tabelle 11: Standardkeimprofil von Rinderhack- und Hähnchenschenkelproben;
arithmetisches Mittel in [KbE/g]

	Rinderhack n = 3	Hähnchenschenkel n = 3
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,2 x 10 ⁵	8,0 x 10 ⁵
Aerob wachsende Milchsäurebakterien	5,3 x 10 ³	3,5 x 10 ³
Lactobazillen	3,1 x 10 ³	4,4 x 10 ³
Pseudomonaden	6,0 x 10 ⁵	2,4 x 10 ³
Aeromonaden	< 10 ²	< 10 ²
Koagulase-positive Staphylokokken	1,0 x 10 ²	< 10 ²
Mikrokokken	9,1 x 10 ³	2,0 x 10 ²
<i>Listeria monocytogenes</i>	< 10 ²	< 10 ²
Sulfitreduzierende Anaerobier	< 10 ¹	< 10 ¹
Enterokokken	< 10 ²	< 10 ²
Enterobakteriazeen	3,5 x 10 ³	1,0 x 10 ²
Coliforme	1,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²
<i>Escherichia coli</i>	< 10 ¹	9,2 x 10 ²
<i>Escherichia coli</i> (Endo)	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²
<i>Bacillus cereus</i>	< 10 ²	< 10 ²
Hefen	2,2 x 10 ³	1,0 x 10 ²
Schimmelpilze	< 10 ²	< 10 ²
Anreicherung auf Salmonellen in 25 g	negativ	negativ

Die gefundenen Spezies decken sich in Vorkommen und Rate mit den von REUTER (2003) zitierten Publikationen.

Während sich bei den Hähnchenschenkeln die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl mit $4,0 \times 10^7$ am stärksten ausgeprägt zeigte, dominierten beim Rinderhack, neben der aeroben mesophilen Keimzahl, die Pseudomonaden mit $6,0 \times 10^5$ KbE/g. Bei Hackfleisch ist ein Anstieg der psychrophilen Pseudomonaden im Zusammenhang mit der Lagerung üblich (WEBER, 2003).

Die orientierende makroskopische Überprüfung der aus Rind und Geflügel auf JM-Platten angezüchteten Bakterien ergab keine Ähnlichkeiten mit der charakteristischen Morphologie von *Arcobacter*-Kolonien (Tabelle 11).

Tabelle 12: Makroskopische Bewertung der Proben auf JM-Platten

	Erscheinungsbild
Rinderhack	In der zweiten Stufe des Verdünnungsausstrichs hellgrau-weiße, runde, matt glänzende Kolonien, Durchmesser 1 mm, sowie schmutzig beige-braune Kolonien gleicher Größe → nicht <i>Arcobacter</i> -verdächtig
Hähnchenschenkel	In der zweiten Stufe des Verdünnungsausstrichs schmutzig beigefarbene, runde, glänzende Kolonien, Durchmesser ≥ 2 mm → nicht <i>Arcobacter</i> -verdächtig

Da unklar blieb, ob die Proben überhaupt *Arcobacter* enthielten, wurden die beiden genannten Matrices daraufhin mit *Arcobacter* beimpft, um die Wiederfindungsrate mit Hilfe des Drop-Plating Verfahren zu ermitteln (Tabelle 8). Für die weiteren Analysen, z. B. für das Drop-Plating-Verfahren oder auch die Beweglichkeitstests, erwies sich die JM-Bouillon als ungeeignet, da aufgrund der Dichte bzw. des Kohlegehaltes Wachstum und Bewegungsverhalten schwer zu erkennen waren. Es wurde daher eine BHI-Bouillon verwendet (JOHNSON et al. 1999) mit einer Inkubation von 48 h bei 30°C. Die Ausgangskonzentration in BHI-Bouillon für die Bestimmung der Wiederfindungsrate betrug dabei: I – III = 10^7 [KBE/g] und IV = 10^8 [KBE/g].

Tabelle 13: Wiederfindungsrate der *Arcobacter*-Stämme (quantitativ)

Ausgangs- konzentration	I <i>A. butzleri</i> 10 ⁷ [KBE/g]	II <i>A. butzleri</i> 10 ⁷ [KBE/g]	III <i>A. cryaerophilus</i> 10 ⁷ [KBE/g]	IV <i>A. skirowii</i> 10 ⁸ [KBE/g]
Rinderhack	2,7 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	Mischkultur	3,9 x 10 ⁸
Hähnchenschenkel	3,5 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁸	Mischkultur	3,9 x 10 ⁸

Die *Arcobacter* Stämme erreichten unter diesen Bedingungen eine Keimzahl von 10⁸ KBE/g, ausgenommen *A. cryaerophilus*, der sich trotz mehrfacher Wiederholung zu keiner ausgeprägten Vermehrung bringen ließ. Hier war lediglich eine Keimzahl von 10³ KBE/g erzielt worden, womit das unsichere Wachstumsverhalten dieses *Arcobacter*-Stammes bestätigt wurde.

Arcobacter skirowii zeigte zwar ein deutliches Wachstum, da aber in den vorher erfolgten Anzuchten nur spärliches oder auch kein Wachstum auf den Platten beobachtet worden war, wurde dieser Stamm nicht als geeignet zur Erstellung einer Positivkontrolle angesehen.

Dagegen setzen sich die *Arcobacter butzleri* Stämme trotz starker Gesamtflora eindeutig durch. Sie erweisen sich somit als geeignet, um die Proben zur Erstellung einer Positivkontrolle zu beimpfen.

4.1.3 Vorversuch III: *Arcobacter*-Anzucht unter Bedingungen für

Campylobacter

Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen *Arcobacter* und *Campylobacter* spp. hinsichtlich sowohl des ausgelösten Krankheitsbildes als auch im Phänotyp der Isolate, kann die Vermutung aufkommen, dass es sich bei als *Campylobacter*-Infektion diagnostizierten Erkrankungen oder bei aus Lebensmitteln isolierten *Campylobacter*-Keimen auch um *Arcobacter* handelt. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden die DSMZ – *Arcobacter* Stämme auf *Campylobacter*-Medien angezüchtet. Dazu erfolgte ein Ausstrich von *Arcobacter* Reinkulturen auf Preston- und Karmali-Plattenmedium (BOLTON und ROBERTSON, 1982) mit anschließender mikroaerober Inkubation bei 42°C für 5 Tage und täglicher Überprüfung der Platten.

In diesem Versuch entwickelte lediglich der *Arcobacter butzleri* Stamm I (DSM-Nr. 8739) nach einem Tag dezente Kolonien auf dem Karmali Agar (KARMALI et al., 1986), woraus sich nach 2 Tagen runde, 1 mm große, glänzende, durchscheinende Kolonien entwickelten. Die übrigen Stämme zeigten kein Wachstum. Damit kann eine Verwechslung von *Arcobacter* mit *Campylobacter* bei der Untersuchung mit den Preston-Nährmedien als unwahrscheinlich

angesehen werden, bei Verwendung des Karmali-Agar sollten weitere Überprüfungen angeschlossen werden.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin zu beachten, dass *Arcobacter*-Spezies, anders als *Campylobacter*, auch aerob wachsen, darüber hinaus zeigen nur wenige Stämme eine Vermehrung bei der für *Campylobacter* typischen Inkubationstemperatur von über 40°C (NACHAMKIM, 1995).

4.1.4 Vorversuch IV: Etablierung der molekularbiologischen Untersuchung

Für den molekularbiologischen Nachweis wurde das Multiplex-PCR Protokoll von HARMON und WESLEY (1997) ausgewählt. Darin werden zwei Primer Sets eingesetzt, von denen der eine einen gattungsspezifischen 16 S rRNA Genabschnitt für *Arcobacter* spp. codiert, der andere den für *Arcobacter butzleri* charakteristischen Abschnitt der 23 S rRNA, so dass für *A. butzleri* in der elektrophoretischen Darstellung eine Doppelbande zu erwarten ist. Bezüglich der Spezifität des Verfahrens wurden in den Studien der beiden Autoren die ATCC Referenzstämme von *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* sowie verwandte Keime wie *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. und *Wolinella* spp. getestet, ebenso verschiedene *Arcobacter* Feldstämme, die vorher als solche durch DNA-DNA-Hybridisierung, Ribotypisierung u. ä. als solche identifiziert worden waren.

Bei der Durchführung der mPCR mit den Referenzstämmen der DSMZ in unserer Studie zeigte *Arcobacter butzleri* in mehreren Durchläufen kontinuierlich die erwartete Doppelbande. *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* hingegen verhielten sich uneinheitlich und nicht so, wie in der Literatur beschrieben. Sie ergaben zunächst z. T. keine, nach diversen Neuansätzen der Kolonien mit Durchführung der PCR dann schließlich stets eine Doppelbande, wie sie eigentlich nur für *A. butzleri* zu erwarten war. Da das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf dem Nachweis der Gattung *Arcobacter* und nicht auf der Speziesidentifikation lag, wurde die Methode dennoch etabliert.

Die Ursache dieser Widersprüche zur Literatur konnten nicht abschließend geklärt werden. In Frage kommen Verunreinigungen im Rahmen der Aufreinigung der DNA, da im Zweifelsfall bereits Spuren von unerwünschter DNA genügen, um ein fehlerhaftes Ergebnis zu produzieren. Natürlich wurde die Arbeitsweise jedoch so gestaltet, dass dieser Störfaktor weitestgehend auszuschließen war, in dem z. B. der Master Mix im Reinraum, die Aufbereitung der Template DNA in einem separaten Labor und generell das Handling der Bakterienkolonien so sorgfältig wie möglich erfolgten. Auch die Aufbereitung der DNA erfolgte in unseren Versuchen anders als in den Studien von HARMON und WESLEY (1997),

jedoch mit einem etablierten Aufbereitungs-Kit, das in verschiedenen anderen PCR Verfahren im Hause keinerlei negative Beeinträchtigung erkennen ließ.

4.1.5 Vorversuch V: Lebensmittelproben

Im Folgenden wurden die zu untersuchenden Lebensmittelproben in den Versuch einbezogen. In diesem Versuchsablauf (6 Versuchsansätze) wurden 15 Hähnchenschenkel und 11 Proben Rinderhackfleisch überprüft (siehe Fließschema Vorversuch V Kapitel 3.3). Die Fleischproben wurden in die JM-Anreicherungsbouillon gegeben und aerob für 48 h bei 30°C bebrütet. Aufgrund der microaerophilen Eigenschaft der *Arcobacter* spp. erfolgte anschließend die Entnahme 1 cm unter der Oberfläche, das Bouillonmaterial wurde aufgeschüttelt und für die Template-DNA-Aufbereitung verwendet sowie parallel auf das JM-Plattenmedium ausgestrichen. Der Ausstrich erfolgte im Doppelansatz, zunächst wurde davon ein Nährboden aerob, der zweite microaerob inkubiert. Da die aerob inkubierten Platten ein stärkeres Wachstum der Konkurrenzflora zuließen, erfolgte bei den weiteren Versuchen (Vorversuch VI, Hauptversuche) ausschließlich eine Bebrütung unter verringertem Sauerstoffgehalt.

Die Daten zur *Arcobacter*-Prävalenz werden zusammen mit den Resultaten des Vorversuchs VI sowie des Hauptversuchs unter 4.2.1 „Übersicht / Gesamtproben“ dargestellt. Aber bereits hier sei angemerkt, dass nicht immer eine Übereinstimmung zwischen dem Ergebnis der PCR und dem kulturellen Befund festgestellt werden konnte. Eine Probe Rinderhack lieferte in der PCR einen positiven, kulturell jedoch einen negativen Befund. Mehrere Faktoren spielten diesbezüglich eine Rolle, insbesondere erforderte die z. T. reichliche Konkurrenzflora auf den Platten eine Subkultivierung der präsumptiven *Arcobacter* Kolonien. Aufgrund des heiklen Wachstumsverhaltens ist jedoch nicht sichergestellt, dass sich die verdächtigen Koloniebildner erneut vermehren. Die Vitalität ist auch hinsichtlich des Beweglichkeitstest entscheidend, da nur vitale Keime die charakteristischen Bewegungen ausführen. So sprachen in der oben genannten Probe zwar die Koloniemorphologie und das Ergebnis aus Oxidase-, Katalasetest und Gramfärbung für *Arcobacter*, jedoch mussten die Keime aufgrund der fehlenden Beweglichkeit letztendlich als negativ bewertet wurde. Ebenfalls ist nicht ausgeschlossen, dass eine fehlerhafte Koloniauswahl getroffen wurde.

Weiterhin ergab eine Probe Hähnchenfleisch einen kulturell positiven, die PCR jedoch einen negativen Befund. Die PCR wurde aus aufbereitetem Material der JM-Anreicherungsbouillon vorgenommen. Hieraus resultiert der positive Effekt, dass mögliche PCR-Inhibitoren aus der Lebensmittelmatrix verdünnt werden. Andererseits enthalten Anzuchtmedien Komponenten,

wie z. B. Blut, Hämoglobin oder in unseren Verfahren Kohle, die zu einer Hemmung der PCR-Reaktion führen können. Denkbar ist auch, dass die Kohlepartikel aus der Anreicherungsbouillon rein mechanisch in der Aufbereitungsspinsäule DNA-Bindungsplätze blockieren und somit ein negatives Ergebnis provozieren.

Die als Positivkontrolle parallel angesetzten, mit *Arcobacter butzleri*-beimpften Hähnchenteilstücke ergaben kontinuierlich einen positiven PCR- und kulturellen Befund, da vorab getestet wurde, mit welchem Stamm eine sichere Wiederfindung gewährleistet ist. Hierfür erwies sich *A. butzleri* II, der DSMZ Stamm 7301, als geeignet. Konkret wurden 16 Hähnchenfleischproben beimpft, jeweils vier mit *A. butzleri* I (DSMZ Nr. 8739), *A. butzleri* II (DSMZ Nr. 7301), *A. cryaerophilus* (DSMZ Nr. 7289) und *A. skirrowii* (DSMZ Nr. 7302). Dabei konnten im kulturellen Verfahren jeweils charakteristische Kolonien nachgewiesen werden, die PCR hingegen ergab, ausgenommen bei *A. butzleri* II, mehrfach negative Ergebnisse aus der Anreicherungsbouillon wie in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Wiederfindungsrate PCR und kulturelles Verfahren (qualitativ; n = 16) [%]

	<i>A. butzleri</i> I beimpfte Proben	<i>A. butzleri</i> II beimpfte Proben	<i>A. cryaerophilus</i> beimpfte Proben	<i>A. skirrowii</i> beimpfte Proben
Wiederfindung kulturell	100 %	100 %	100 %	100 %
Wiederfindung PCR	75 %	100 %	50 %	75 %

4.1.6 Vorversuch VI: Optimierte Vorgehensweise

In den 7 Versuchsgängen wurden 39 Hähnchen- und 38 Rinderhackfleischproben untersucht. Die Vorgehensweise entsprach der soeben geschilderten. Da jedoch kulturell häufiger ein *Arcobacter*-Verdacht bestand, als sich in der simultanen PCR ergab, andererseits eine Probe aber nur bei Übereinstimmung beider Techniken als positiv galt, wurden im folgenden präsumptive *Arcobacter*-Kolonien in einem weiteren PCR Schritt bestätigt. Diese wurden bei Bestätigung als positiv gewertet, auch wenn die erste PCR aus der Anreicherungsbouillon ein negatives Ergebnis erbracht hatte. Hierdurch konnte die Fehlerquote durch die erschwerte DNA-Aufbereitung aus dem kohlehaltigen Medium gesenkt werden. Dabei ergab sich, dass alle morphologisch verdächtigen Kolonien auch in der PCR *Arcobacter*-spezifische Banden zeigten. Von den 39 Hähnchenschenkeln konnten 8 *Arcobacter*-positive Proben und von den 38 Rinderhackfleisch Proben konnte eine positive ermittelt werden, wobei davon 3 der

Geflügel- sowie die eine Rinderprobe in der ersten PCR aus der Anreicherungsbouillon ein negatives Ergebnis zeigten, nach dem kulturellen Befund und der daraus geführten PCR jedoch als positiv zu bewerten waren. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit dem Hauptversuch graphisch und tabellarisch im Kapitel 4.2.1 dargestellt.

Im Anschluss an diese orientierenden Versuche wurden Rinderhack und Hähnchen-Proben im Hauptversuch auf das Vorhandensein von *Arcobacter*-Kontaminationen überprüft.

4.2 Hauptversuch:

Der Hauptversuche bestanden aus 5 Versuchsdurchläufen (V1 – V5), in denen 25 Proben Rinderhack, 25 Hähnchenschenkel von Hähnchen aus konventioneller und 25 von Hähnchen aus ökologischer Haltung untersucht wurden.

4.2.1 Übersicht Gesamtproben Rind/Huhn

Da die mikrobielle Belastung in erster Linie eine Funktion der Herkunft und Verarbeitung des Fleisches ist (MAC et al., 2006a), wurde in der vorliegenden Arbeit Rinderhack und Hähnchenfleisch aus unterschiedlicher Herkunft (konventionelle Tierhaltung, biologische Haltung sowie Einzelhandel mit verschiedenen Zulieferern) untersucht.

Im Zuge einer Vorversuchsreihe wurde die Vorgehensweise optimiert. So kristallisierte sich eine Analysenreihenfolge heraus, bei der zunächst jeweils eine kulturelle Isolierung vorgenommen wurde, um anschließend die Gattungszugehörigkeit mithilfe der PCR zu bestätigen. Dazu wurden nach Anreicherung in JM-Bouillon Ausstriche auf JM-Platten und PCR-Analysen der angezüchteten Kolonien durchgeführt. Kulturell verdächtige Proben wurden mithilfe einer zweiten PCR bestätigt. Tabelle 15 gibt eine Übersicht der Versuchsergebnisse.

Tabelle 15: Gesamtübersicht der Versuchsergebnisse:

Anzahl der *Arcobacter*-positiven Proben

	Rinder- hack (n)	Rinder- hack positive Proben (%/n)	Gefl. konv. (n)	Gefl. konv. positive Proben (%/n)	Gefl. öko. (n)	Gefl. öko. positive Proben (%/n)
Vorver- suche	50	3 (6 %)	46	17 (37 %)	7	3 (43 %)
Haupt- versuch	25	0 (0 %)	25	14 (56 %)	25	5 (20 %)
Vor + Haupt- versuche	75	3 (4 %)	71	31 (44 %)	32	8 (25 %)

Gefl.: Geflügel (Hähnchenkeulen)

Konv.: Hähnchen aus konventioneller Haltung

Öko.: Hähnchen aus ökologischer Haltung

Wie auch die Darstellung in Abbildung 3 verdeutlicht, wurden die höchsten Belastungen bei konventionellen Geflügel-Proben gefunden. In den untersuchten Rinderhack-Proben ließ sich nur eine geringe *Arcobacter*-Belastung feststellen.

Kontaminationsraten im Vor- und Hauptversuch in %

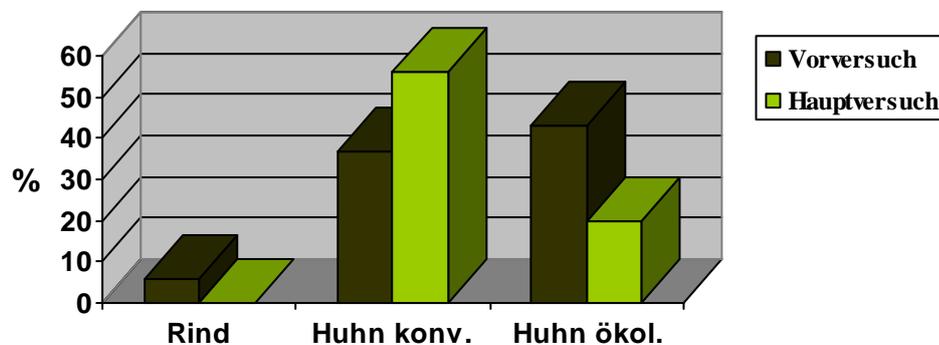


Abbildung 5: Kontaminationsraten der untersuchten Proben: Vor- und Hauptversuche in [%]

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Einzelnen erläutert.

4.2.2 Einzelergebnisse

Ergebnisse Rind

Während im Vorversuch aus 3 von 50 Rinderhackproben *Arcobacter* spp. isoliert werden konnten, ließen sich diese Keime in den 25 Proben des Hauptversuchs nicht nachweisen.

Beim Vergleich mit dem zugänglichen Schriftum zeigt sich zunächst, dass bisher wenige Veröffentlichungen über *Arcobacter*-Funde in Rindfleisch existieren. KELLER et al. (2006) ermittelten die *Arcobacter*-Prävalenz bei Rind, Schwein und Geflügel aus der Produktionskette. Dabei ergab keine Kotprobe, entnommen aus dem Zäkum von 210 Rindern auf dem Schlachthof, ein *Arcobacter*-positives Ergebnis in der PCR. 19,7 % der von der Oberfläche der Schlachtierkörper entnommenen Proben (41/208) waren PCR-positiv, jedoch keine der Fleischproben (0/150).

ÖNGÖR et al. (2004) ermittelten in 5 % der untersuchten Hackfleischproben vom Rind *Arcobacter butzleri*.

Verbreiteter beim Rind scheint das Vorkommen von *Campylobacter* spp. zu sein. Die bisherigen Untersuchungen an Fleisch als Träger von *Campylobacter* spp. unterscheiden sich jedoch deutlich in der gefundenen Prävalenz (ATABAY und CORRY, 1998b). Da die Isolierungsrate von der Anreicherungs-methode abhängt, wurde z.B. bei vorangestellter Anreicherung in 89,4 % der Proben dieser Keim nachgewiesen, ohne Anreicherung dagegen nur zu 26,7 % (STANLEY et al., 1998). Darüber hinaus wurden auch saisonale Abhängigkeiten erkannt: in den Sommermonaten stiegen die Kontaminationsraten. Diese Ergebnisse beziehen sich auf Untersuchungen des Intestinaltraktes.

Ergebnisse Huhn

Während die Tabelle 15 die Resultate aller Vor- und Hauptversuche enthält, zeigen Tabelle 16 und Abbildung 6 die Resultate, die im Hauptversuch für die Geflügelfleisch-Proben ermittelt wurden. Die Probenkollektive waren unterschiedlich hoch kontaminiert. Bis auf die Gruppe V2 wurde überall *Arcobacter* nachgewiesen. Die Rate lag zwischen 33 % und 100 %.

Die in Koloniemorphologie, Gramfärbung, Oxidase- und Katalasereaktion verdächtigen Proben wurden durch eine 2. PCR als *Arcobacter* bestätigt. Lediglich bei den Kontingenten V1 und V2 ließ sich je eine Probe nicht aus der Anreicherungsbouillon direkt in der PCR verifizieren. Morphologisch verdächtige Kolonien mit charakteristischen Reaktionen

molekularbiologisch zu bestätigen, erbrachte die höhere Nachweisrate und verdeutlicht, dass die kulturelle, zeitaufwendige Technik nicht durch die PCR aus der Anreicherungsbouillon ersetzt werden kann.

Gemäß Abbildung 6 lag die Belastung bei konventionellem Hähnchenfleisch deutlich höher als bei den Proben aus ökologischer Haltung, so wurde in 56 % der konventionellen Proben *Arcobacter* gefunden, gegenüber 20 % der ökologischen Haltung.

Tabelle 16: *Arcobacter* Nachweisrate bei Hähnchenfleisch im Hauptversuch

	PCR aus Anreicherung	Gramfärbung Beweglichkeit	Oxidase	Katalase	Bestätigung durch PCR
V1: 5 Proben konventionell	4 Proben + 80%	5 Proben typ. 100%	5 Proben + 100%	5 Proben + 100%	5 Proben + 100%
V1: 5 Proben ökologisch	1 Probe + 20%	1 Probe typ. 20%	1 Probe + 20%	1 Probe + 20%	1 Probe + 20%
V2: 6 Proben konventionell	1 Probe + 16,7%	2 Proben typ. 33,3%	2 Proben + 33,3%	2 Proben + 33,3%	2 Proben + 33,3%
V2: 6 Proben ökologisch	negativ	keine typ.	keine +	keine +	keine +
V3: 5 Proben konventionell	3 Proben + 60%	3 Proben typ. 60%	3 Proben + 60%	3 Proben + 60%	3 Proben + 60%
V3: 6 Proben ökologisch	1 Probe + 16,6%	1 Probe typ. 16,6%	1 Probe + 16,6%	1 Probe + 16,6%	1 Probe + 16,6%
V4: 5 Proben konventionell	1 Probe + 20%	1 Probe typ. 20%	1 Probe + 20%	1 Probe + 20%	1 Probe + 20%
V4: 4 Proben ökologisch	2 Proben + 50%	2 Proben typ. 50%	2 Proben + 50%	2 Proben + 50%	2 Proben + 50%
V5: 4 Proben konventionell	3 Proben + 75%	3 Proben typ. 75%	3 Proben + 75%	3 Proben + 75%	3 Proben + 75%
V5: 4 Proben ökologisch	1 Probe + 25%	1 Probe typ. 25%	1 Probe + 25%	1 Probe + 25%	1 Probe + 25%

+ = positiver PCR Nachweis bzw. positiver Oxidase- und Katalasetest

typ. = typisch, charakteristisches Färbverhalten und Beweglichkeitsmuster

negativ = kein positiver PCR Nachweis bzw. kein charakteristisches Färbverhalten,

Beweglichkeitsmuster, negativer Oxidase- und Katalasetest

Nachweisrate *Arcobacter* in Huhn im Hauptversuch in %

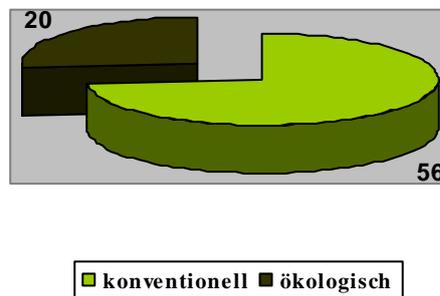


Abbildung 6: *Arcobacter* Nachweisrate in Hähnchenschenkeln im Hauptversuch gegliedert nach konventioneller und ökologischer Haltung [%]

Im Hinblick auf die bisher publizierten Statuserhebungen erweist sich die Situation als recht uneinheitlich. So gelang EIFERT et al. (2003) durch Infektion mit verschiedenen Keimmengen ab einer Dosis von 10^6 oder 10^9 KbE der Nachweis von *A. butzleri* im Kot. Bis zu einer applizierten Menge von 10^3 KbE je Huhn wurden keine *A. butzleri*-Keime ausgeschieden.

Vermutlich bietet der Gastrointestinaltrakt von Geflügel aufgrund seiner hohen Körpertemperatur (41°C) für die nicht-thermophilen *Arcobacter* spp. eine Umgebung, in der Vermehrung bzw. Überleben eingeschränkt sind (HO et al., 2006b) und es ist anzunehmen, dass diese Keime nicht zur normalen Darmflora des Geflügels gehören (ATABAY und CORRY, 1997). In einer Studie von HOUF et al. (2002b) wurden im Verdauungsapparat von 30 Broilern keine *Arcobacter* nachgewiesen, dagegen aber wurden positive Befunde in den Transportkäfigen vor und nach dem Waschen protokolliert.

ATABAY et al. (2006) untersuchten Enten, Hühner und Truthähne mithilfe der mPCR. In dieser Erhebung war der Befall bei den lebenden Enten höher als bei den übrigen Arten. Dagegen erwiesen sich alle Hühner nach dem Schlachten als *Arcobacter*-positiv und zwar wurden in 72 % der untersuchten Intestinalproben von Broilern *Arcobacter butzleri* nachgewiesen sowie in 4,3 % der Proben *A. cryaerophilus*.

GUDE et al. (2005) fanden keine Kontamination in den untersuchten Geflügelherden, aber *Arcobacter butzleri* im Abwasser außerhalb der Zuchtgehege. Sie postulierten, dass der Erreger bei der Verarbeitung auf das Fleisch übertragen wird, weil in den Tieren selbst keine positiven Nachweise zu führen waren.

KELLER et al. (2006) fanden in ihrer Studie große Unterschiede zwischen Proben vor und nach der Schlachtung: in 1,4 % der vor dem Töten gewonnenen Kloakentupferproben, aber in

53,6 % der post mortem entnommenen Halshautproben ergaben sich PCR-positive Nachweise von *Arcobacter*. Wurden aus Handlungspackungen Haut- und Muskelproben entnommen, so ergaben sich 64,7 % bzw. 15,1 % positive Befunde.

SON et al. (2007) bestätigten die Ergebnisse von KELLER et al. (2006), nach denen die Belastung vor der Schlachtung höher ausfiel (hier 96 %) als nach der Schlachtung (9,6 %).

4.3 Eignung der Untersuchungsmethoden

4.3.1 JOHNSON & MURANO

Die Methode nach JOHNSON und MURANO wird in diversen Studien als eine geeignete Nachweismethode für *Campylobacter* bzw. *Arcobacter* beschrieben. JOHNSON und MURANO (1999b) selbst berichteten über eine Nachweisrate von 84 % bei Hähnchenfleischproben. VILLARRUEL-LOPEZ et al. (2003) veröffentlichten Nachweisraten von 40 % für Hühnerfleisch, 51,1 % für Schweinefleisch und 28,9 % für Rindfleisch.

MORITA et al. (2004) sowie GONZALEZ et al. (2000) verglichen die Methoden nach DE BOER- bzw. COLLINS (AB mit CAT - nach COLLINS et al., 1996a) mit dem Verfahren nach JOHNSON-MURANO. Sie erreichten höhere Nachweisraten mit dem JM-Plating.

GOLLA et al. (2002) untersuchten Proben von gesunden Rindern mit Hilfe der JOHNSON-MURANO-Methode parallel zur COLLINS-Methode (EMJH-P80-Bouillon und CVA-Agar) und bestätigten die bessere Sensitivität der JM-Technik, wobei die besten Ergebnisse mit CVA-Agar erreicht wurden. OHLENDORF und MURANO (2002a) verglichen die COLLINS-, die modifizierte COLLINS-, die DE BOER-(*Arcobacter*-Selektivbouillon und -Selektivmedium) und die JOHNSON-MURANO-Methode an 200 Schweinehackfleischproben im Hinblick auf Kontamination mit *Arcobacter* spp. Am erfolgreichsten hinsichtlich quantitativer und beständiger Detektion zeigte sich das JM-Verfahren, bei dem aus 64 der 200 Proben *Arcobacter* isoliert werden konnten. Die modifizierte COLLINS-Methode (Direkt COLLINS, siehe Kapitel 2.5.1) erbrachte immerhin noch 52 positive Ergebnisse, die zwei weiteren Verfahren jedoch einen noch geringeren Anteil der Proben.

In einer ergänzenden Studie derselben Autoren wurde die Sensitivität der genannten drei Verfahren verglichen. Auch hier schnitt die Technik nach JOHNSON-MURANO am besten ab: bis zu einer Konzentration von 10^1 CFU/g ließ sich *A. butzleri* bei 100 % und *A. cryaerophilus* bei 75 % der untersuchten Schweinehackfleischproben nachzuweisen (OHLENDORF und MURANO, 2002b).

Diese Ergebnisse fanden ihre Bestätigung in der vorliegenden Arbeit, denn die *Arcobacter*-Spezies konnten gut differenziert werden. Dabei sei jedoch erwähnt, dass die Herstellung der Medien sehr zeitintensiv ist, welches sie für den Einsatz in der Routinediagnostik kaum geeignet erscheinen lassen.

Bereits in vorangegangenen Studien war die Schlussfolgerung gezogen worden, dass die genannten kulturellen Nachweismethoden allein nicht genug aussagekräftig sind. Die Ergebnisse besitzen nur orientierenden Charakter, in dem sie eine Tendenz aufzeigen oder Hinweise auf verdächtige Proben liefern. Zur Absicherung einer Aussage und zur Erhöhung von Selektivität und Sensitivität wird in der Literatur seit längerem empfohlen, zwei unterschiedliche Nachweisverfahren nebeneinander zu verwenden (ATABAY et al., 1997; COLLINS et al., 1996a; OHLENDORF und MURANO, 2002a; SCULLION et al., 2004).

Die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Aussagen. Die Methode nach JOHNSON-MURANO konnte als orientierender Hinweis gelten, wogegen, wie weiterführende Studien zeigen, das Verfahren nach HOUF et al. (2001b) sich als eine sehr selektive und geeignete Isolierungsmethode für *Arcobacter* erwiesen hat (TESCHKE, 2008). Ein entscheidendes Kriterium bildet dabei auch die Unterdrückung der Begleitflora. Zudem gestaltet es sich in der Durchführung relativ einfach sowie zeit- und kostengünstig.

4.3.2 HARMON & WESLEY

Die PCR an sich wurde bereits in verschiedenen Arbeiten als gut geeignetes Nachweisverfahren für *Campylobacter* und *Arcobacter* bestätigt (DEBRUYNE et al., 2008; GONZALES et al., 2007; PHILLIPS, 2001). ÖNGÖR et al. (2004) heben die Zeitersparnis hervor. Der Einsatz der mPCR nach HOUF erscheint empfehlenswert, laut einer Studie aus dem Jahr 2008 an Hunden und Katzen gestattete diese Methode eine Differenzierung zwischen den *Arcobacter*-Spezies (HOUF et al., 2008).

Ursprünglich sollte in den vorliegenden Versuchen die PCR parallel zur Kultivierung nach JM durchgeführt werden, also direkt aus der Anreicherungsbouillon vorgenommen werden. Allerdings zeigte sich in zu wenigen Fällen eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Möglicherweise störte hier die kohlehaltige Anreicherungsbouillon, deren Partikel sich in der Aufbereitungsspinnsäule immer wieder ablagerten und so wahrscheinlich DNA-Bindungsplätze blockierten.

Wesentliche Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Nachweismethode bzw. die Kombination der kulturellen mit der elektrophoretischen Methode zu optimieren. Wird die PCR nur für die Bestätigung verdächtiger Kolonien eingesetzt, besteht die Gefahr, kulturell nicht erfasste Spezies zu übersehen. Daher hat sich folgende Methode als optimal erwiesen: Eine erste PCR aus der angereicherten Probe, gefolgt von einer Kultivierung auf JM-Platten und der Überprüfung im Oxidase- und Katalase-Test, sowie im Anschluss daran bei Vorliegen von morphologisch verdächtigen Kolonien eine Bestätigung der kulturellen Ergebnisse durch die PCR.

Eine Eigenschaft der Multiplex-PCR sollte sein, die *Arcobacter*-charakteristischen Banden trennen zu können, beispielsweise in 2 typische Banden für *Arcobacter butzleri*. In früheren Studien wurde die PCR als geeignet angesehen, um *Arcobacter butzleri* von *A. cryaerophilus* zu trennen (GUDE et al., 2005; SON et al. 2007). Leider stellte sich in den eigenen Versuchen heraus, dass sich die Situation komplizierter gestaltete. *A. butzleri* zeigte immer die 2 für diese Spezies typischen Banden, *A. cryaerophilus* und *A. skirowii* bildeten hingegen zunächst teilweise keine Bande aus, teilweise die eine erwartete Bande und in den weiteren Versuchen dann stets 2 Banden, was eigentlich typisch für *A. butzleri* wäre. Eine Differenzierung war somit erschwert.

5 Schlussfolgerungen

5.1 Eignung der Untersuchungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit konnten die *Arcobacter*-Spezies mithilfe der Kombination aus der Anzuchtmethode nach JOHNSON und MURANO mit der PCR nach HARMON und WESLEY isoliert und differenziert werden.

Wie die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit zeigen, kann es keine Empfehlung geben, die genannten kulturellen Nachweismethoden als einzige Methode zu verwenden, da sie allein keine ausreichende Aussagefähigkeit besitzt. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen wäre daher zu konstatieren, dass die kulturellen Nachweismethoden nur orientierenden Charakter haben können. Mit ihrer Hilfe lassen sich Tendenzen erkennen oder *Arcobacter*-verdächtige Proben herausfiltern. Um eine hinreichende Selektivität und Sensitivität zu erhalten, wird daher von verschiedenen Autoren die Verwendung zweier unterschiedlicher sich ergänzender Nachweisverfahren empfohlen (ATABAY und CORRY, 1997; OHLENDORF und MURANO, 2002a; SCULLION et al., 2004; TESCHKE, 2008).

Den Vorschlag einer Methodenkombination bestätigten die vorliegenden Untersuchungen. Das Verfahren nach JOHNSON und MURANO sollte gemäß der eigenen Versuchsreihen nur als orientierender Hinweis gelten. In der Arbeit von TESCHKE (2008) zeigte sich dagegen das Verfahren nach HOUF et al. (2001b) als eine sehr selektive und deshalb geeignete Isolierungsmethode für *Arcobacter*, insbesondere weitgehenden Unterdrückung der Begleitflora. Als weiterer Vorteil kommt die einfache sowie zeit- und kostengünstige Durchführung hinzu. Nach den hier gewonnenen Erkenntnissen erfolgt die Bebrütung jeweils am günstigsten microaerob (Campy Kit von Oxoid) bei 28°C bzw. 30°C für 48 h, auch wenn die Keime in der Lage sind, aerob zu wachsen. Die Überimpfung aus der Bouillon sollte kurz unter der Oberfläche erfolgen.

In den Versuchsreihen, in denen die PCR parallel zur Kultivierung nach JOHNSON und MURANO direkt aus der Anreicherungsbouillon eingesetzt wurde, zeigte sich nicht immer eine Übereinstimmung der Ergebnisse des kulturellen mit dem molekularbiologischen Verfahren. Infolge dessen wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Nachweismethode hinsichtlich der Kombination der kulturellen mit der elektrophoretischen Methode zu optimieren. Als erstes Ergebnis wurde die PCR daher als Bestätigungsnachweis kulturell verdächtigter Kolonien eingesetzt.

Allerdings besteht die Gefahr, auf den Nährböden nicht erfasste Spezies zu übersehen, wenn die PCR ausschließlich zur Bestätigung verdächtigter Kolonien verwendet wird. Daher hat

sich in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt, dass die Abfolge einer ersten PCR aus der angereicherten Probe, gefolgt von kultureller Anzucht auf JM-Platten und der Überprüfung im Oxidase- und Katalase-Test, sowie im Anschluss daran bei Vorliegen von morphologisch verdächtigen Kolonien eine Bestätigung der kulturellen Ergebnisse durch eine weitere PCR, die optimale Vorgehensweise darstellt.

GUDE et al. (2003) und SON et al. (2007) setzten bei Abwasser bzw. Intestinalproben die Multiplex-PCR ein, um *Arcobacter*-charakteristische Banden unterscheiden zu können, beispielsweise zur Abgrenzung von *Arcobacter butzleri* gegenüber *A. cryaerophilus*. Nur *Arcobacter butzleri* soll zwei typische Banden ausbilden. Leider war diese Option in unseren Versuchen nicht hinreichend gegeben. Zwar zeigte *A. butzleri* immer die zwei für diese Spezies typischen Banden, *A. cryaerophilus* und *A. skirowii* hingegen wiesen teilweise keine Bande auf, in anderen Fällen wiederum die für *A. butzleri* typischen zwei Banden. Eine Differenzierung über die PCR fiel somit nicht eindeutig aus.

5.2 Kontamination von Rind und Huhn mit *Arcobacter*

Während in den vorliegenden Rinderhack-Proben der Hauptversuchsreihe keine *Arcobacter*-Kontaminationen gefunden wurden, waren die Geflügelfleisch-Probenkontingente überwiegend, aber unterschiedlich hoch mit *Arcobacter* kontaminiert. Die Rate lag zwischen 33 % und 100 %.

Die Arbeit von TESCHKE 2008 an Geflügelfleisch und Schweinefleisch ergab, dass 80,1 % der Putenfleischproben mit *Arcobacter* belastet waren, mit einer Verteilung von 72,2 % an *A. butzleri*, 3,3 % an *A. cryaerophilus* und 4,6 % an *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*. Von den Schweinefleischproben waren 48,4 % mit *Arcobacter* spp. belastet, wobei in 39,8 % der Fälle *A. cryaerophilus* und in 8,6 % *A. butzleri* nachgewiesen wurde.

Wie bisher in Frankreich, Belgien und die USA gezeigt, ist auch in Deutschland bei Frischgeflügel mit einer hohen *Arcobacter*-Kontaminationsrate zu rechnen. Rindfleisch hingegen scheint, in Übereinstimmung mit den wenigen Untersuchungen, die bisher im Ausland durchgeführt worden sind, auch in Deutschland nur selten mit *Arcobacter* infiziert zu sein.

Die Studienlage zeigt eine allgemein hohe Kontamination von Geflügelfleisch mit *Arcobacter* spp. Verantwortlich für diesen Umstand können die Haltungsbedingungen sein, da sich Krankheitserreger bei räumlich engen Bedingungen schnell verbreiten. Futter, Wasserqualität, Feuchtigkeit und Temperatur spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. WESLEY et al. (2000) führten diesbezüglich Untersuchungen an Milchkühen durch. Die Prävalenz von *Arcobacter*

in den Herden erwies sich als geringer, wenn die Tiere mit Luzerne gefüttert wurden und ihnen Einzeltränken zur Verfügung standen, auch die Fütterung von Brauerei Nebenprodukten besaß einen positiven Effekt. Kleine Herden zeigten einen geringern Befall (5,1, %) als große Herden (14,7 %).

Die bisherigen Untersuchungen der diskutierten Studien belegen, dass in der Regel für das Auftreten von *Arcobacter* in Fleischproben weitaus häufiger eine Kontamination der Umgebung der entsprechenden Tiere verantwortlich ist, als ein Befall der Tiere selbst. Eine wichtige Rolle scheint zu spielen, dass die Besiedlung über Erreger in Wasser, Wasserleitungen und im Schlachthof stattfindet (ASSANTA et al., 2002; GUDE et al., 2005; GONZALEZ et al., 2007; HO et al., 2008b; KELLER et al. 2006; VAN DRIESSCHE und HOUF, 2008).

Diese Befunde machen nicht nur weitere Überprüfungen notwendig, sondern deuten auf die Dringlichkeit der Hygiene bei allen die Verarbeitung begleitenden Prozessen hin, um ein Einschleppen der Keime so gering wie möglich zu halten.

Eine Optimierung der Nachweisverfahren, sowie eine Darstellung der spezifischen Faktoren, die auf den Nachweis von *Arcobacter* störend wirken, wären hilfreich und bieten ein weiteres Forschungsfeld.

6 Zusammenfassung

Einsatz von kulturellen Nachweis nach JOHNSON & MURANO und Multiplex PCR nach HARMON & WESLEY zur Ermittlung des Vorkommens von *Arcobacter* spp. bei Frischgeflügel und Rinderhack im Berliner Einzelhandel

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, die Nachweismöglichkeit von *Arcobacter* spp. in frischem Fleisch zu überprüfen sowie Daten über die Häufigkeit von Kontaminationen in frischen Hähnchenkeulen und Rinderhack mit kulturellen und molekularbiologischen Methoden zu ermitteln. Dazu wurden Proben aus konventioneller Geflügelhaltung mit Fleisch aus biologischer Haltung verglichen. Als Nachweisverfahren wurde die von JOHNSON und MURANO (1999) empfohlene kulturelle Methode und die von HARMON und WESLEY (1997) speziesspezifische mPCR-Analyse ausgewählt.

Die Stämme der *Arcobacter*-Kulturen wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

Die *Arcobacter*-verdächtigen Kolonien wurden makroskopisch sowie biochemisch (Katalase-Test, Oxidase-Test) und mikroskopisch auf Gram-Färbung und Beweglichkeit überprüft und anschließend einer mPCR nach HARMON und WESLEY (1997) unterzogen. In Vorversuchen wurden der Gesamtstatus der beiden Lebensmittel sowie die Wiederfindungsrate bei gespikten Proben überprüft. Zur Erstellung einer Positivkontrolle erwies sich *Arcobacter butzleri* aufgrund seines Wachstums auch bei hoher Keimbelastung als geeignet.

Werden Vor- und Hauptversuch zusammengeführt, konnte aus 3 der 75 (= 4 %) Rinderhack-Proben *Arcobacter* isoliert werden. Dagegen waren 39 von 103 (= 38 %) der Geflügelfleisch-Proben mit *Arcobacter* spp. kontaminiert. Proben aus konventioneller Haltung waren dabei häufiger belastet als Proben aus ökologischer Haltung (44 % zu 25 %). Die kulturellen Ergebnisse verdächtiger Proben ließen sich mithilfe der PCR bestätigen.

Die Kombination der beiden Methoden (Anzuchtmethode nach JOHNSON & MURANO mit der PCR nach HARMON & WESLEY) empfiehlt sich zum Nachweis einer Kontamination mit *Arcobacter* spp.

7 Summary

Using the microbiological analysis by JOHNSON & MURANO and the multiplex PCR by HARMON & WESLEY for the identification of *Arcobacter* spp. in fresh poultry and minced beef sold in retail markets in Berlin

The objective of this study was to reassess the alternatives for the detection of *Arcobacter* spp. in fresh meat and to collect data on the prevalence of contamination in fresh chicken thighs and minced beef, using microbiological and molecular biological methods. Additionally samples of meat from conventional husbandry were compared to those from organic husbandry. For microbiological analysis the methods by JOHNSON & MURANO and the multiplex PCR by HARMON & WESLEY were applied.

Presumptive *Arcobacter* colonies were macroscopically, biochemically (catalase-test, oxidase-test) and microscopically tested for Gram-stain and motility and subsequently underwent PCR-reaction by HARMON and WESLEY (1997). In preliminary trials the overall status of the two foodstuffs and the recovery rate of highly contaminated samples were examined. Because of its high tenacity *Arcobacter butzleri* proved suitable for the preparation of positive control samples.

Taken the preliminary and main trials together, *Arcobacter* spp. was isolated from 3 out of 75 (4 %) samples of minced beef. In contrast, 39 out of 103 samples of poultry were contaminated with *Arcobacter* spp. (38 %). Chicken samples originating from conventional husbandry were more often affected than those from organic husbandry (44 % vs. 25 %). Microbiological findings in suspicious samples were confirmed by PCR.

The combination of both methods (selective media by JOHNSON and MURANO and PCR by HARMON and WESLEY) can be recommended for the detection of a contamination with *Arcobacter* spp.

8 Literaturverzeichnis

ABDELBAQI, K.; BUISSONNIERE, A.; PROUZET-MAULEON, V.; GRESSER, J.; WESLEY, I.; MEGRAUD, F.; MENARD, A.; (2007)

Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species

J. Clin. Microbiol. **45**, 3015-3021

ADESIJI, Y. O. (2010)

Faecal shedding of *Arcobacter* species following experimental infection in rats: Public health implications

Central European J. Med. **5**, 470-474

ALISPAHIC, M.; HUMMEL, K.; JANDRESKI-CVETKOVIC, D.; NÖBAUER, K.; RAZZAZI-FAZELI, E.; HESS, M.; HESS, C. (2010)

Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis

J. Med. Microbiol. **59**, 295-301

ANDERSON, K. F.; KIEHLBAUCH, J.A.; ANDERSON, D. C.; MCCLURE, H. M.; WACHSMUTH, I. K. (1993)

Arcobacter (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population

Infect. Immun. **61**, 2220-2223

ASSANTA, M.A.; ROY, D.; LEMAY, M. J.; MONTPETIT, D. (2002)

Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces

J. Food Prot. **65**, 1240-1247

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

The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens

J. Appl. Microbiol. **83**, 619-625

ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L. (1998a)

Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for the enrichment of *Campylobacter* spp.

Int. J. Food Microbiol. **41**, 53-58

ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L. (1998b)

The isolation and prevalence of *campylobacters* from dairy cattle using a variety of methods

J. Appl. Microbiol. **84**, 733-740

ATABAY, H.I.; CORRY, J.E.L.; ON, S.L. (1998)

Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens

J. Appl. Microbiol. **84**, 1007-1016

ATABAY, H. I.; AYDIN, F. (2001)

Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents

Lett. Appl. Microbiol. **33**, 430-433

ATABAY, H. I.; AYDIN, F.; HOUF, K.; SAHIN, M.; VANDAMME, P. (2003)

The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey and identification of the isolates using SDS-PAGE

Int. J. Food Microbiol. **25**, 21-28

ATABAY, H. I.; WAINØ, M.; MADSEN, M. (2006)

Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry

Int. J. Food Microbiol. **109**, 139-45

ATANASSOVA, V.; KESSEN, V.; REICH, F.; KLEIN, G. (2008)

Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation

J. Food Prot. **71**, 2533-2536

AYDIN, S.; GURE, H.; CAKICI, H.; COLAKOGLU, S.; BIRCAN, R. (2009)

Gross pathology, blood chemistry, lipid and peroxide contents in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) affected by experimental *Arcobacter cryaerophilus* infection at low water temperature

Acta Vet. Hung. **57**, 305-307

BARTHOLOMÄ, A.; NAUMANN, H. (2006)

Arcobacter in Lebensmitteln

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Online) Volume 1, Supplement 2 / Dezember 2006, 1661-5867

BASTYNS, K.; CHAPELLE, S.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H.; DE WACHTER, R. (1995)

Specific detection of *Campylobacter concisus* by PCR amplification of 23S rDNA areas

Mol. Cell. Probes. **9**, 247-250

BLANKENSHIP, L. C.; CRAVEN S. E. (1982):

Campylobacter jejuni survival in chicken meat as a function of temperature

Appl. Environ. Microbiol. **44**, 88-92

BLASER, M.J.; MOSS, C. M.; WEAVER, R. (1980)

Cellular fatty acid composition of *Campylobacter fetus*

J. Clin. Microbiol. **11**, 448-451

BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. (1982)

A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Journal of Clinical Pathology. **35**, 462-467

BRIGHTWELL, G.; MOWAT, E.; CLEMENS, R.; BOEREMA, J.; PULFORD, D. J.; ON, S. L. (2007)

Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* und *Arcobacter cryaerophilus*

J. Microbiol. Meth. **68**, 318-325

BRÜCKER, R.; TROEGER, H.; KLEER, J.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. (2009)

Arcobacter butzleri induces barrier dysfunction in intestinal HAT-29/B6 cells

J. Infect. Dis. **200**, 756-764

BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG (2007)

Arcobacter spp. in rohem Fleisch kann beim Menschen Lebensmittelinfektionen auslösen

Stellungnahme Nr. 046/2007 des BfR vom 1. November 2007, 1-11

ČERVENKA, L.; ZACHOVA, I.; MINARAKOVA, P.; VYTRASOVA, J. (2003)

Effect of pH and water activity on the growth of *Arcobacter sp.* in culture

Czech J. Food Sci. **21**, 203-209

ČERVENKA L.; MALIKOVA, Z.; ZACHOVA, I.; VYTRASOVA, J. (2004)

The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture

Folia Microbiol. **49**, 8-12

ČERVENKA, L.; PESKOVA, I.; FOLTYNOVA, E.; PEJCHALOVA, M.; BROZKOVA, I.; VYTRASOVA, J. (2006)

Inhibitory effects of some spice and herb extracts against *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii*

Current Microbiol, **53**, 435-439, DOI: 10.1007/s00284-006-0244-x

ČERVENKA, L.; KRISTLOVA, J.; PESKOVA, I.; VYTRASOVA, J.; PEJCHALOVA, M.; BROZKOVA, I. (2008)

Persistence of *Arcobacter butzleri* CCUG 30484 on plastic, stainless steel and glass surfaces

Brazilian J. Microbiol. **39**, 517-520

COLLADO, L.; INZA, I.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. (2008)

Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution

Environ. Microbiol. **10**, 1635-1640

COLLADO, L.; CLEENWERK, I.; VAN TRAPPEN, S.; DE VOS, P.; FIGUERAS, M. J. (2009a)

Arcobacter mytili sp. nov., an indoxyl acetate hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels

Int. Syst. Evol. Microbiol. **59**, 1391-1396

COLLADO, L.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J. (2009b)

Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish

J. Food Prot. **72**, 1102-1106

COLLADO, L.; KASIMIR, G.; PEREZ, U.; BOSCH, A.; PINTO, R.; SAUCEDO, G.; HUGUET, J. M.; FIGUERAS, M. J. (2010a)

Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant

Water Res. **44**, 3696-702

COLLADO, L.; LEVICAN, A.; PEREZ, J.; FIGUERAS, M. J. (2010b)

Arcobacter defluvii sp. nov., isolated from sewage samples

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Published online ahead of print on 1 October 2010 as DOI 10.1099/ijs.0.025668-0

COLLADO GONZÁLEZ, L. R. (2010)

Taxonomy und Epidemiology of the genus *Arcobacter*

Universitat Rovira I Virgili, ISBN: 978-84-693-0707-6 /DL:T-420-2010

COLLADO, L.; FERNANDEZ, H.; FIGUERAS, M. J.

Arcobacter valdiviensis sp. nov., isolated from a chicken cloacal swab sample in Valdivia, Chile (eingereicht)

In: COLLADO GONZÁLEZ, L. R. (2010)

Taxonomy und Epidemiology of the genus *Arcobacter*

Universitat Rovira I Virgili, ISBN: 978-84-693-0707-6 /DL:T-420-2010, S. 121

COLLINS, C. I.; WESLEY, I. V.; MURANO, E. A. (1996a)

Detection of *Arcobacter* spp in ground pork by modified plating methods

J. Food Prot. **59**, 448-452

COLLINS, C. I.; MURANO, E. A.; WESLEY, I. V. (1996b)

Survival of *Arcobacter butzleri* and *Campylobacter* after irradiation treatment in vacuum-packaged ground pork

J. Food Prot. **59**, 1164-1166

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

Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*

Int. J. Food Microbiol. **38**, 201-209

CORRY, J. E. L.; ATABAY, H. I. (2001)

Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms

J. Appl. Microbiol. **90**, 96-114

CURTIS, M. A. (1982)

Cellular fatty acid and profiles of *campylobacters*

In Newell, DG (ed.): *Campylobacter* Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry, MTP Press Limited, Lancaster, Boston, 234-241

DE BOER, E.; TILBURG, J. J.; WOODWARD, D. L.; LIOR, H.; JOHNSON, W. M. (1996)

A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats

Lett. Appl. Microbiol. **23**, 64-66

DEBRUYNE, L.; SAMYN, E.; DE BRANDT, E.; VANDENBERG, O.; HEYNDRICKS, M.; VANDAMME, P. (2008)

Comparitive performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Res. Microbiol. **159**, 88-93

DEBRUYNE, L.; HOUF, K.; DOUIDAH, L.; DE SMET, S.; VANDAMME, P. (2010)

Reassessment of the taxonomy of *Arcobacter cryaerophilus*

Syst. Appl. Microbiol. **33**, 7-14

DE GUSSEME, B.; DE SCHRYVER, P.; DE COOMAN, M.; VERBEKEN, K.; BOECKX, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. (2009)

Nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria as microbial oxidants for rapid biological sulfide removal

FEMS Microbiol. Ecol. **67**, 151-61

DE OLIVERIA, S. J.; BAETZ, A. L.; WESLEY, I. V.; HARMON, K. M. (1997)

Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil

Vet. Microbiol. **57**, 347-354

DE RIJK, P.; NEEFS, J. M.; VAN DER PEER, Y.; DE WACHTER, R. (1993)

Compilation of small ribosomal subunit RNA structures

Nucleic Acids Res. **21**, 3025-3049

DE SMET, S.; DE ZUTTER, L.; VAN HENDE, J.; HOUF, K. (2010a)

Arcobacter contamination on pre- and post-chilled bovine carcasses and in minced beef at retail

J. Appl. Microbiol. **108**, 299-305

DE SMET, S.; VANDAMME, P.; DE ZUTTER, L.; ON, S. L. W.; DOUIDAH, L.; HOUF, K. (2010b)

Arcobacter trophiarum sp. nov. isolated from fattening pigs

Int J Syst Evol Microbiol; Published online ahead of print on 19 March 2010 as DOI

10.1099/ijms.0.022665-0

DONACHIE, S. P.; BOWMAN, J. P.; ON, S. L.; ALAM, M. (2005)

Arcobacter halophilus sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter* Int. J.

Syst. Evol. Microbiol. **55**, 1271-1277

DOUIDAH, L.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P.; HOUF, K. (2010)

Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay

J. Microbiol. Methods **80**, 281-286

D'SA, E. M.; HARRISON, M. A. (2005)

Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp.

J. Food Prot. **68**, 18-25

EIFERT, J. D.; CASTLE, R. M.; PIERSON, F. W.; LARSEN, C. T.; HACKNEY, C. R. (2003)

Comparison of sampling techniques for Detection of *Arcobacter butzleri* from chickens

Poultry Science **82**, 1898-1902

ELLIS, W. A.; NEILL, S. D.; O'BRIAN, J. J.; FERGUSON, H. W.; HANNA, J. (1977)

Isolation of spirillum/vibrio-like organisms from bovine fetuses

Vet. Rec. **100**, 451-452

ERTAS, N.; DOGRUER, Y.; GONULALAN, Z.; GUNER, A.; ULGER, I. (2010)

Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by Multiplex PCR

J. Food Protect. **73**, 2099-2102

FEDOROVICH, V.; KNIGHTON, M. C.; PAGALING, E.; WARD, F. B.; FREE, A.; GORYANIN, I.
(2009)

Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Arcobacter butzleri*,
isolated from a microbial fuel cell

Appl. Environ. Microbiol. **75**, 7326-7334

FERA, M. T.; MAUGERI, T. L.; GIANNONE, M.; GUGLIANDOLO, C.; LA CAMERA, E.; BLANDINO,
G.; CARBONE, M. (2003)

In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different
antimicrobial agents

Int. J. Antimicrob. Agents **21**, 488-491

FERA, M. T.; MAUGERI, T. L.; GUGLIANDOLO, C.; LA CAMERA, E.; LENTINI, V.; FAVALORO, A.;
BONANNO, D.; CARBONE, M. (2008)

Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells

Appl. Environ. Microbiol. **74**, 3266-3268

FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; CARBONE, M.; MALARA, D.; PENNISI MG (2009)

Pet cats as carriers of *Arcobacter spp.* in Southern Italy

J. Appl. Microbiol. **106**, 1661-1666

FERA, M. T.; GUGLIANDOLO, C.; LENTINI, V.; FAVALORO, A.; BONANNO, D.; LA CAMERA, E.;
MAUGERI, T. L. (2010a)

Specific detection of *Arcobacter spp.* in estuarine waters of Southern Italy by PCR and
fluorescent in situ hybridization

Lett. Appl. Microbiol. **50**, 65-70

FERA, M. T.; RUSSO, G. T.; DI BENEDETTO, A.; LA CAMERA, E.; ORLANDO, A.; GIANDALIA, A.; RUFFA, V. F.; LANZA, G.; LENTINI, V.; PERDICHIZZI, G.; CUCINOTTA, D. (2010b)

High Prevalence of *Arcobacter* carriage in older subjects with type 2 diabetes

J. Biomed Biotechnol. Article ID 489784, 7 pages doi:10.1155/2010/489784

FERNANDEZ, H.; ELLER, G.; PAILLACAR, J.; GAJARDO, T.; RIQUELME, A. (1995)

Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*

Mem. Inst. Oswaldo Cruz **90**, 633-634

FESTY, B.; SQINAZI, F.; MARIN, M.; DERIMAY, R.; LIOR, H. (1993)

Poultry meat and water as the possible sources of *Arcobacter butzleri* associated with human disease in Paris

France. Acta Gastro-enterologica Belgica, **56**, 35

FIGUERAS, M. J.; COLLADO, L.; GUARRO, J. (2008)

A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **62**, 11-15

GARREN, M.; RAYMUNDO, L.; GUEST, J.; HARVELL, C. D.; AZAM, F. (2009)

Resilience of coral-associated bacterial communities exposed to fish farm effluent

PLoS One. **4**, e7319

GARRITY, G. M., BELL, J. A. & LILBURN, T. (2004)

Taxonomic Outline of the Prokaryotes

Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, 2nd edition, Release 5.0, 137-139; DOI:

10.1007/bergeysoutline 200405

GOLLA, S. C.; MURANO, E. A.; JOHNSON, L. G.; TIPTON, C.; CUREINGTON, E. A.; SAVELL, W. (2002)

Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods

J. Food Prot. **65**, 1849-1853

GONZALEZ, I.; GARCIA, T.; ANTOLIN, A.; HERNANDEZ, P. E.; MARTIN, R. (2000)

Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat

Lett. Appl. Microbiol. **30**, 207-212

GONZÁLEZ, A.; MORENO, Y.; GONZALES, R.; HERNANDEZ, J.; FERRUS, A. (2006)

Development of a simple and rapid method based on Polymerase Chain Reaction-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* species

Current Microbiology **53**, 416-421

GONZALEZ, A.; BOTELLA, S.; MONTES, R. M.; MORENO, Y.; FERRUS, M. A. (2007)

Direct detection and identification of *Arcobacter* species by Multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain

J. Food Prot. **70**, 341-347

GONZÁLEZ, A.; SUSKI, J.; FERRÚS, M. A. (2010)

Rapid and accurate detection of *Arcobacter* contamination in commercial chicken products and wastewater samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction Foodborne Pathog. Dis. **7**, 327-333

GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M. D., SLY, L.; MCCONNELL, W.; HARPER, W. E. S. (1989)

Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively

Int. J. Syst. Bacteriol. **39**, 397-405

GUDE, A.; HILLMAN, T. J.; HELPS, C. R.; ALLEN, V. M.; CORRY, J. E. (2005)

Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing

Lett. Appl. Microbiol. **41**, 82–87

HAN, P.; ZHENG, L.; CUI, Z. S.; GUO, X. C.; TIAN, L. (2009)

Isolation, identification and diversity analysis of petroleum-degrading bacteria in Shengli Oil Field wetland soil

Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. **20**, 1202-1208

HARMON, K. M.; WESLEY, I. V. (1996)

Identification of *Arcobacter* isolates by PCR

Lett. Appl. Microbiol. **23**, 241-244

HARMON; K. M.; WESLEY; I. V. (1997)

Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *arcobacters*

Vet. Microbiol. **58**, 215-227

HAZELEGER, W. C.; SONNEMANS, E. T. H.; DOBBELSTEIN; S. H. J. M.; BEUMER, R. R. (2003)

Survival of *Arcobacter butzleri* on stainless steel- and chicken surfaces and resistance to gamma-irradiation and cleaning and disinfection

Int. J. Medical Microbiol. **293**, 87- 88

HENSYL, W. R. (1994)

In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9. Auflage. Baltimore: Williams & Wilkins, 39-63

HIGGINS, R.; MESSIER, S.; DAIGNAULT, D.; LORANGE, M. (1999)

Arcobacter butzleri isolated from a diarrhoeic non-human primate

Lab. Anim. **33**, 87-90

HILTON, C. L.; MACKEY, B. M.; HARGREAVES, A. J.; FORSYTHE, S. J. (2001)

The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments

J. Appl. Microbiol. **91**, 929-932

HO, H. T. K.; LIPMAN, L. J. A.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS; L.; VAN BERGEN, M.;
GAASTRA, W. (2006a)

Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets

Vet. Microbiol. **114**, 122-133

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. (2006b)

Arcobacter, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent

Vet. Microbiol. **115**, 1-13

HO, T. K. H.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. (2008a)

The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens

Poult. Sci. **87**, 2404-2407

HO, H.; LIPMAN, L. J. A.; GAASTRA, W. (2008b)

The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses

Int. J. Food Microbiol. **125**, 223-229

HOOSAIN, N.; LASTOVICA, A. J. (2009)

An evaluation of the Oxoid Biochemical Identification System Campy rapid screening test for Campylobacteraceae and *Helicobacter* spp.

Lett. Appl. Microbiol. **48**, 675-679

HOUF, K.; TUTENEL, A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. (2000)

Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*

FEMS Microbiol. Lett. **193**, 89-94

HOUF, K.; DEVRIESE, L. A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. (2001 a)

Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media

J. Clin. Microbiol. **39**, 1654-1656

HOUF, K.; DEVRIESE, L. A.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. (2001b)

Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products

Int. J. Food Microbiol. **71**, 189-196

HOUF, K.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. (2002a)

Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods

Appl. Environ. Microbiol. **68**, 2172-2178

HOUF, K.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J.; VANDAMME, P. (2002b)

Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing

J. Food Prot. **65**, 1233-1239

HOUF, K.; DE ZUTTER, L.; VERBEKE, B.; VAN HOOF, J.; VANDAMME, P. (2003)

Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse

J. Food Prot. **66**, 364-369

HOUF, K.; ON, S. L.; COENYE, T.; MAST, J.; VAN HOOF, J.; VANDAMME, P. (2005)

Arcobacter cibarius sp. nov., isolated from broiler carcasses

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**, 713–717

HOUF, K.; DE SMET, S.; BARÉ, J.; DAMINET, S. (2008)

Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*

Vet. Microbiol. **130**, 208-213

HOUF, K.; ON, S. L.; COENYE, T.; DEBRUYNE, L.; DE SMET, S.; VANDAMME, P. (2009)

Arcobacter thereius sp. nov., isolated from pigs and ducks

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**, 2599-2604

HOUF, K. (2009)

Arcobacter in a food safety prospective

Arch. Lebensmittelhyg. **60**, 73-76

HSUEH, P. R.; TENG, L. J.; YANG, P. C.; WANG, S. K.; CHANG, S. C.; HO, S. W.; HSIEH, W. C.,
LUH, K. T. (1997)

Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B

J. Clin. Microbiol. **35**, 489-491

HUME, M. E.; HARVEY, R. B.; STANKER, L. H.; DROLESKEY, R. E.; POOLE, T. L.; ZHANG, H. B. (2001)

Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility

J. Food Prot. **64**, 645-651

HURTADO, A.; OWEN, R. J. (1997)

A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species

J. Clin. Microbiol. **35**, 2401-2404

IBELGAUFTS, H. (1993)

Gentechnologie von A bis Z

VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim

JACOB, J.; LIOR, H.; FEUERPFEL, I. (1993)

Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in Eastern Germany

Zentralbl. Hyg. **193**, 557-562

JIANG ZD, DUPONT HL, BROWN EL, NANDY RK, RAMAMURTHY T, SINHA A, GHOSH S, GUIN S, GURLEEN K, RODRIGUES S, CHEN JJ, MCKENZIE R, STEFFEN R (2010)

Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala and India importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* Species

J. Clin. Microbiol. **48**, 1417-1419

JOHNSON, J.; KAIJSER, B.; SVEDHEM, A. (1982)

Fatty acid composition: A possible tool for typing different *Campylobacter* species In: Newell, D.G. (Hrsg.): *Campylobacter* Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry

MTP Press Limited, Lancaster; Boston, 106-110

JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. (1999a)

Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry

J. Food Prot. **62**, 610-614

JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. (1999b)

Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter spp.*

J. Food Prot. **62**, 610-614

KABEYA, H.; KOBAYASHI, Y.; MARUYAMA, S.; MIKAMI, T. (2003a)

One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species

Int. J. Food Microbiol. **81**, 163-168

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; KUBO, M.; YAMAMOTO, K.; ARAI, S.; IZUMI, Y.;
KOBAYASHI, Y.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. (2003b)

Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan

Vet. Microbiol. **93**, 153-158

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; ABE, M.;
KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. (2004)

Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the
isolates in Japan

Int. J. Food Microbiol. **90**, 303-308

KARMALI, M. A.; SIMOR, A. B.; ROSCOE, M.; FLEMING, P. C.; SMITH, S. S., LANE; J. (1986)

Evaluation of a blood-free, charcoal-based selective medium for the isolation of
Campylobacter organisms from feces

J. Clin. Microbiol. **23**, 456-459

KELLER, S.; RÄBER, S.; TASARA, T.; STAPHAN, R. (2006)

Prävalenz von *Arcobacter butzleri* in Kotproben, auf Schlachtkörpern und in Fleisch aus dem Handel bei Rind, Schwein und Geflügel in der Schweiz

Arch. Lebensmittelhyg. **57**, 64-68

KIEHLBAUCH, J. A.; BRENNER, D. J.; NICHOLSON, M. A.; BAKER, C. N.; PATTON, C. M.; STEIGERWALT, A. G.; WACHSMUTH, I. K. (1991a)

Campylobacter butzleri sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness

J. Clin. Microbiol. **29**, 376-385

KIEHLBAUCH, J. A.; PLYAYTIS, B. D.; SWAMINATHAN, B.; CAMERON, D. N.; WACHSMUTH, I. K. (1991b)

Restriction Fragment Length Polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species

J. Clin. Microbiol. **29**, 1670-1676

KIM, H. M.; HWANG, C. Y.; CHO, B. C. (2010)

Arcobacter marinus sp. nov.

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**, 531-536; DOI 10.1099/ijs.0.007740-0; in press

KJELDGAARD, J.; JØRGENSEN, K.; INGMER, H. (2009)

Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*

Int. J. Food Microbiol. **131**, 256-259

LAMMERDING, A.; HARRIS, J. E.; LIOR, H.; WOODWARD, D. E.; COLE, L.; MUCKLE, C. (1996)

Isolation method for recovery of *Arcobacter butzleri* from fresh poultry and poultry products

Newell D: Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms. Plenum Press: New York, 329-333

LAU, A. K. P.; WOO, P. C. Y.; TENG, J. L. L.; LEUNG, K. W.; YUEN, K. Y. (2002)

Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis

Journal of Clinical Pathology: Mol. Pathol. **55**, 182-185

LEE, M. H.; CHEON, D. S.; CHOI, S.; LEE, B. H.; JUNG, J. Y.; CHOI, C. (2010)

Prevalence of *Arcobacter* species isolated from retail meats in Korea

J. Food Prot. **73**, 1313-1316

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. (2005)

Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen

Int. J. Food. Microbiol. **102**, 127-135

LERNER, J.; BRUMBERGER, V.; PREAC-MURSIC, V. (1994)

Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**, 660-662

LIOR, H. J.; WOODWARD, D. (1993)

Arcobacter butzleri: A serotyping scheme

Microb. Ecol. Health Dis. 4 (special issue): S. 93

LIU, Y. J.; CHEN, Y. P.; JIN, P. K.; WANG, X. C. (2009)

Bacterial communities in a crude oil gathering and transferring system (China)

Anaerobe. **15**, 214-218

LOGAN, E.; NEILL, S. D.; MACKIE, D. P. (1982)

Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*

Vet. Rec. **110**, 229-230

LONG, C.; PHILLIPS, C. A. (2003)

The effect of sodium citrate, sodium lactate and nisin on the survival of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 on chicken

Food Microbiol. **20**, 495-502

MAC, K.; MELCHNER, T.; PETERS, J.; ELLERBROEK, L. (2006a)

Arcobacter spp. along the food chain: prevalence in meat samples and effects of meat processing parameters on the traceability

Tagung Food Micro; 28.8. –3. 9. 2006, Bologna

MAC, K.; MELCHNER, T.; PETERS, J.; TOUTOUNIAN, K.; ELLERBROEK, L. (2006b)

Arcobacter spp. along the food chain: Effects of meat processing parameters on the traceability and survival potential

Amtstierärztl. Dienst. Sonderausgabe 26.-29.9.2006b (ISSN 0945-3296), 244

MANKE, T. R. (1997)

A survey of mechanically separated turkey for the presence of *Arcobacter butzleri* and the genetic variability of *Arcobacter butzleri* isolates

MS Thesis, Iowa State University, Ames Iowa

MANKE, T. R.; WESLEY, I. V.; DICKSON, J. S.; HARMON, K. M. (1998)

Prevalence and genetic variability of *Arcobacter* species in mechanically separated turkey

J. Food Prot. **61**, 1623-1628

MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. (2000)

Arcobacter butzleri, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus* - potential emerging human Pathogens

Reviews in Medical Microbiol **11**, 161-170

MARINESCU, M.; COLLIGNON, A.; SQUINAZI, F.; WOODWARD, D.; LIOR, H. (1996)

Biotypes and serogroups of poultry strains of *Arcobacter* spp. isolated in France

Campylobacters, Helicobacters related organisms.

New York: Plenum Press, 519-520

MARSHALL, S. M.; MELITO, P. L.; WOODWARD, D. L.; JOHNSON, W. M.; RODGERS, F. G.;
MULVEY, M. R. (1999)

Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by
PCRrestriction length fragment polymorphism analysis of the 16s rRNA gene

J. Clin. Microbiol. **37**, 4158-4160

MAUGERI, T. L.; GUGLIANDOLO, C.; CARBONE, M.; CACCAMO, D.; FERA, M. T. (2000)

Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment

New Microbiol. **23**, 143-149

MCCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G.; DAVIS, R. E. (1983)

Campylobacter nitrofigilis sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with roots of
Spartina alterniflora Loisel

Int. J. Syst. Bacteriol. **33**, 605-612

MILLER, W. G.; PARKER, C. T.; RUBENFIELD, M.; MENDZ, G. L.; WOSTEN, M. M.; USSERY, D.
W.; STOLZ, J. F.; BINNEWIES, T. T.; HALLIN, P. F.; WANG, G.; MALEK, J. A.; ROGOSIN, A.;
STANKER, L. H.; MANDRELL, R. E. (2007)

The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter*
butzleri

PLoS One 2, e1358

MORENO, Y.; BOTELLA, S.; ALONSO, J. L.; FERRÚS, M. A.; HERNÁNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, J. (2003)

Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization
Appl. Environ. Microbiol. **69**, 1181-1186

MORITA, Y.; MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; BOONMAR, S.; NIMSUPHAN, B.; NAGAI, A.; KOZAWA, K.; NAKAJIMA MIKAMI, T.; KIMURA, H. (2004)

Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand
Microbiol. Imm. **48**, 527-533

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. A.; SCHARF, J.; SAIKI, R. K.; HORN, G. T.; EHRLICH, H. A. (1986)

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, **51**, 263-273

MUSMANNO, R. A.; RUSSI, M.; LIOR, H.; FIGURA, N. (1997)

In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples
New Microbiol. **20**, 63-68

NACHAMKIN, I. (1995)

Campylobacter and *Arcobacter*

In Balows WJ, Hausler Jr, KL Hermann and DH Isenberg (ed). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American society for Microbiology: Washington DC, 483-491

NEILL, S. D.; CAMPBELL, J. N.; O'BRIAN, J. J.; WEAHTHERUP, S. T. C.; ELLIS, W. A. (1985)

Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov.
Int. J. Syst. Bacteriol. **35**, 342-356

NEWLL, D. G.; KETTLEY, J. M.; FELDMAN, R. A. (1996)

Campylobacters, Helicobacters and related organisms

Plenum Press, ISBN 0-306-45312-6, NewYork and London

OHLENDORF, D. S.; MURANO, E. A. (2002a)

Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods

J. Food Protect. **65**, 1700-1705

OHLENDORF, D. S.; MURANO, E. A. (2002b)

Sensitivity of three methods used in the isolation of *Arcobacter* spp. in raw ground Pork

J. Food Protect. **65**, 1784-1788

ÖNGÖR, H.; CENTINKAYA, B.; ACIC, M. N.; ATABAY, H. I. (2004)

Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey

Lett. Appl. Microbiol. **38**, 339-344

ON, S. L. W.; STACEY, A.; SMYTH, J. (1995)

Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia

J. Infect. **31**, 225-227

ON, S. L. W. (1996)

Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms Clin.

Microbiol. Rev. **9**, 405-422

ON, S. L.; HOLMES, B.; SACKIN, M. J. (1996)

A probability matrix for the identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa

J. Appl. Bacteriol. **81**, 425-432

ON, S. L. W.; HARRINGTON, C. S. ; ATABAY, H. I. (2003)

Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces

J. Appl. Microbiol. **95**, 1096-1105

ON, S. L. W. ; JENSEN, T. K.; HANSEN, V. B.; JORSAL, S. E.; VANDAMME, P. (2002)

Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark

Vet. Microbiol. **85**, 159-167

OTTH, L.; WILSON, M.; FERNÁNDEZ, H. (2001)

Dessication resistance in *Arcobacter butzleri*

Braz. J. Microbiol. **32**, 311-312

OTTH, L.; SOLÍS, G.; WILSON, M.; FERNÁNDEZ, H. (2005)

Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to heavy metals

Braz. J. Microbiol. **36**, 286-288

PARK, S. (2005)

Campylobacter: stress response and resistance

In: M. Griffiths (ed.) Understanding Pathogen Behaviour, Cambridge:

Woodhead, 279-308

PEJCHALOVÁ, M.; DOSTALÍKOVÁ, E.; SLÁMOVÁ, M.; BROZKOVÁ, I.; VYTRASOVÁ, J. (2008)

Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic

J. Food Prot. **71**, 719-727

PETERS, J.; MELCHNER, T.; MAC, K. N.; TOUTOUNIAN, K.; REETZ, J.; ALTER, T.; ELLERBROEK, L. (2006)

Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Hähnchen- und Schweinefleisch aus dem Einzelhandel
Amtstierärztl. Dienst. Sonderausgabe 26.-29.9.2006 (ISSN 0945-3296), 264

PETERSEN, R. F.; HARRINGTON, C. S.; KORTEGAARD, H. E.; ON, S. L. (2007)

A PCR- DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related Epsilonbacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets

J. Appl. Microbiol. **103**, 2601-2615

PHILLIPS, C. A. (1999)

The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*

Lett. Appl. Microbiol. **29**, 424-428

PHILLIPS, C. A.; DUGGAN, J. (2001)

The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture

Food Microbiol. **18**, 547-554

PHILLIPS, C. A. (2001)

Arcobacter spp. in food: isolation, identification and control

Trends Food Science & Technol. **12**, 263-275

PHILLIPS, C. A.; DUGGAN, J. (2002)

The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture

Food Control **12**, 463-468

PHILLIPS, C. A.; BATES, P. (2004)

The survival of *Arcobacter butzleri*, an emerging human pathogen, in the presence of acids and ethanol

Nutrition & Food Science **34**, 210-215

PROUZET-MAULEON, V.; LABADI, L.; BOUGES, N.; MENARD, A.; MEGRAUD, F. (2006)

Arcobacter butzleri: underestimated enteropathogen

Emerg. Inf. Dis. **12**, 307-309

QUIÑONES, B.; PARKER, C. T.; JANDA JR, J. M.; MILLER, W. G.; MANDRELL, R. E. (2007)

Detection of DNA oligonucleotide arrays and genotyping of *Arcobacter* and *Campylobacter* isolates from retail chicken samples by use

Appl. Environ Microbiol. **73**, 3645-3655

RAZI, M. H. H.; PARK, R. W. A. (1982)

Some simple tests for differentiating between campylobacters

In: Newell, D.G.(ed.): *Campylobacter* Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry. MTP Press Limited, Lancaster, Boston, 59

REUTER, G (2003)

Mikrobiologie des Fleisches

in: Weber, H. (Hrsg.), Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch und Fleischerzeugnisse, S. 6 ff. ;S. 40 ff.

RIDSDALE, J. A.; ATABAY, H. I.; CORRY, J. E. L. (1998)

Prevalence of campylobacters and arcobacters in ducks at the abattoir

J. Appl. Microbiol. **85**, 567-573

RITCHIE, A. E.; KEELER, R. F.; BRYNER, J. H. (1966)

Anatomical features of *Vibrio fetus*: Electron microscopic survey

J. Gen. Microbiol. **43**, 427-438

RIVAS, L.; FEGAN, N.; VANDELINDE, P. (2004)

Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat

Int. J. Food Microbiol. **91**, 31-41

SCHROEDER-TUCKER, L.; WESLEY, I. V.; KIEHLBAUCH, J. A.; LARSON, D. J., THOMAS, L. A.;
ERICKSON, G. A. (1996)

Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses

J. Vet. Diag. Invest. **8**, 142-148

SCULLION, R.; HARRINGTON, C. S.; MADDEN, R. H. (2004)

A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* species isolated from retail raw poultry in Northern Ireland

J. Food Prot. **67**, 799-804

SEBALD, M.; VÉRON, M. (1963)

Base DNA content and classification of vibrios

Ann Inst. Pasteur (Paris), **105**, 897-910

SHIN, K. S.; SON, B. R.; HONG, S. B. A. (2005)

Case of bacteremia caused by *Arcobacter butzleri*

Korean J. Lab. Med. **25**, 259-261

SINELL, H.-J. (2004)

Einführung in die Lebensmittelhygiene

Campylobacter spp.

Parey: Berlin und Hamburg, 4. Auflage, 43-45

SKERMAN, V. B. D.; MC GOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (1980)

Approved Lists of Bacterial Names

Int. J. Syst. Bacteriol. **30**, 225-420

SKIRROW, M. B.; BENJAMIN, J. (1980)

“1001” Campylobacters: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals

J. Hyg. Camb. **85**, 427-442

SKŘIVANOVÁ, E.; MOLATOVÁ, Z.; MATĚNOVÁ, M.; HOUF, K.; MAROUNEK, M. (2010)

Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin

Int. J. Food Microbiol. - Article in Press, Accepted Manuscript doi:10.1016/j.ijfoodmicro, 10.021

SPROCKHOFF, H. (1979)

Die Überlebensfähigkeit bestimmter Krankheitserreger unter Umwelteinflüssen

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, **86**, 33-36

SMIBERT, R. M. (1974)

Campylobacter

In: Buchanan RE, Gibbons NE (editors) Bergey' s Manual of determinative bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 207-211

SMITH, T.; TAYLOR, M. S. (1919)

Some morphological and biochemical characters of the spirilla (*Vibrio fetus* n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle

J. Exp. Med. **30**, 299-311

SON, I.; ENGLER, M. D.; BERRANG, M. D.; FEDORKA-CRAY, P. J.; HARRISON, M. A. (2007)

Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing

Int. J. Food Microbiol. **113**, 6-22

STAMPI, S.; VAROLI, O.; ZANETTI, F.; DE LUCA, G. (1993)

Arcobacter cryaerophilus and thermophilic campylobacters in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatments compared

Epidemiol. Infect. **110**, 633-639

STAMPI, S.; DE LUCA, G.; VAROLI, O.; ZANETTI, F. (1999)

Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter* in sewage sludge

Zentralbl. Hyg. Umweltmed. **202**, 19-27

STANLEY, K. N.; WALLACE, J. S.; CURRIE, J. E.; DIGGLE, P. J.; JONES, K. (1998)

The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle, and calves

J. Appl. Microbiol. **85**, 472-80

STANLEY, K. N.; WALLACE, J. S.; CURRIE, J. E.; DIGGLE, P. J.; JONES, K. (1998b)

Seasonal variation of thermophilic campylobacters in lambs at slaughter

J. Appl. Microbiol. **84**, 1111-1116

SUAREZ, D. L.; WESLEY, I. V.; LARSON, D. J. (1997)

Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine

Vet. Microbiol. **4**, 325-336

TAYLOR, D. N.; KIEHLBAUCH, J. A.; TEE, W.; PITARANGSI, C.; ECHEVERRIA, P. (1991)

Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea

J. Infect. Dis. **163**, 1062-1067

TEE, W.; BAIRD, M.; DYALL-SMITH, M.; DWYER, B. (1988)

Campylobacter cryaerophilus isolated from a human

J. Clin. Microbiol. **26**, 2469-2473

TESCHKE, M. (2008)

Prävalenz von *Arcobacter* spp. in Puten- und Schweinefleisch aus dem Berliner Einzelhandel und Vergleich von drei kulturellen *Arcobacter*-Nachweisverfahren

Vet. med. Dissertation FU-Berlin Online:

http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000004482

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; POT, B. (1989)

Identification of EF group 22 campylobacters from gastroenteritis cases as *Campylobacter concisus*

J. Clin. Microbiol. **27**, 1775-1781

VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. (1990)

Intra- and interspecific relationships of veterinary campylobacters and revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DNA:DNA hybridizations Systemtic Appl.

Microbiol. **13**, 295-303

VANDAMME, P.; DE LEY, J. (1991a)

Proposal for a new family, Campylobacteraceae

Int. J. System. Bact. **41**, 451-455

VANDAMME, P.; FALSEN, E.; ROSSAU, R.; HOSTE, B.; SEGERS, P.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. (1991b)

Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen.

Int. J. Syst. Bacteriol. **41**, 88-103

VANDAMME, P.; GOOSSENS, H. (1992)

Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: A review

Zentralbl. Bakteriolog. **276**, 447-72

VANDAMME, P.; VANCANNEYT, M.; POT, B.; MELS, L.; HOSTE, B.; DEWETTINCK, D.; VLAES, L.; VAN DEN BORRE, C.; HIGGINS, R.; HOMMES, J.; KERSTERS, K.; BUTZLER, J. P.; GOOSSENS, H. (1992a)

Polyphasic taxonomic study of the emended Genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens

Internat. J. Systemat. Bacteriol. **42**, 344-356

VANDAMME, P.; PUGINA, P.; BENZI, G.; VAN ETTERIJCK, R.; VLAES, L.; KERSTERS, K.; BUTZLER, J. P.; LIOR, H.; LAUWERS, S. (1992b)

Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school

J. Clin. Microbiol. **30**, 2335-2337

VANDAMME, P.; GIESENDORF, B. A.; VAN BELKUM, A.; PIERARD, D.; LAUWERS, S.; KERSTERS, K.; BUTZLER, J. P.; GOOSSENS, H.; QUINT, W. G. (1993)

Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain-reaction-mediated DNA fingerprinting

J. Clin. Microbiol. **31**, 3317-3319

VANDENBERG, O.; DEDISTE, A.; HOUF, K.; IBEKWEM, S.; SOUAYAH, H.; CADRANEL, S.; DOUAT, N.; ZISSIS, G.; BUTZLER, J. P.; VANDAMME, P. (2004)

Arcobacter species in humans

Emerg. Infect. Dis. **10**, 1863-1867

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K.; VAN HOF, J.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P. (2003)

Isolation of *Arcobacter* species from animal faeces

FEMS Microbiol. Lett. **229**, 243-248

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K.; VANGROENWEGHE, F.; NOLLET, N.; DE ZUTTER, L.; VANDAMME, P.; VAN HOOFF, J. (2004)

Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian Pigs
Research Microbiol. **155**, 662-666

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K.; VANGROENWEGHE, F.; DE ZUTTER, L.; VAN HOOFF, J. (2005)

Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium

Vet. Microbiol. **105**, 149-154

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K. (2007a)

Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork

Int. J. Food Microbiol. **118**, 20-26

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K. (2007b)

Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chicken and broiler carcass contamination

Poult. Sci. **86**, 744-751

VAN DRIESSCHE, E.; HOUF, K. (2008)

Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions

J. Appl. Microbiol. **105**, 443-451

VÉRON, M.; CHATELAIN, R. (1973)

Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotyp strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron

Int. J. Syst. Bacteriol. **23**, 122-134

VERON, M.; LENVOISE-FURET, A. L. (1982)

Anaerobic respiration of fumarate by catalase-positive *Campylobacters*

In: Newell DG (ed.): *Campylobacter* Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry. MTP Press Limited: Lancaster, Boston, 57-58

VILAR, M. J.; PEÑA, F. J.; PEREZ, I.; DIEGUEZ, F. J.; SANJUAN, M. L.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; YUS, E. (2010)

Presence of *Listeria*, *Arcobacter*, and *Campylobacter* spp. in dairy farms in Spain

Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. **123**, 58-62

VILLARRUEZ-LOPEZ, A.; MARQUEZ-GONZALES, M.; GARAY-MARTINEZ, L. E.; ZEPEDA, H.; CASTILLO, A.; MOTA DE LA GARZA, L.; MURANO, E. A.; TORRES-VITELA, R. (2003)

Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero cells

J. Food Prot. **66**, 1374-1378

WEBER H (2003)

Mikrobiologie der Lebensmittel. Fleisch - Fisch Feinkost

Behr's Verlag: Hamburg, 117-118

Wesley I. V. (1994)

Arcobacter infections.

In: Beran, G. W. and Steele, J. H. (ed.) Handbook of Zoonoses, : CRC Press, Boca Raton, Florida, 181-190

WESLEY, I. V. (1995)

Oligonucleotide probes for the genus *Arcobacter* and for *Arcobacter butzleri* based on 16S rRNA sequence

J. Clin. Microbiol. **77**, 1691-1698

WESLEY, I. V. (1996)

Helicobacter and *Arcobacter* species: Risks for foods and beverages

J. Food Prot. **59**, 1127-1132

WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L.; LARSON, D. J. (1996)

Infection of cesarean-derived colostrumdeprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*

Infect. Immunm. **64**, 2295-2299

WESLEY, I. V. (1997)

Helicobacter and *Arcobacter*: Potential human foodborne pathogens?

Trends Food Sci. Technol. **8**, 293-299

WESLEY, I. V.; BAETZ, A. L. (1999)

Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry

Poultry Sci. **78**, 536-545

WESLEY, I.; WELLS, S. J.; HARMON, K. M.; GREEN, A.; SCHROEDER-TUCKER, L.; GLOVER, M.; SIDDIQUE, I. (2000)

Faecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle

Appl. Environ. Microbiol. **66**, 1994-2000

WIRSEN, C. O.; SIEVERT, S. M.; CAVANAUGH, C. M.; MOLYNEAUX, S. J.; AHMAD, A.; TAYLOR, L. T.; DE LONG, E. F.; TAYLOR, C. D. (2002)

Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulphur

Appl. Environ. Microbiol. **68**, 316-325

WYBO, I.; BREYNAERT, J.; LAUWERS, S. (2004)

Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea

J. Clin. Microbiol. **42**, 1851-1852

YAN, J. J.; WANG, W. C.; HUANG, A. H.; CHEN, H. M.; JIN, Y. T.; WU, J. J. (2000)

Arcobacter butzleri bacteremia in a patient with liver cirrhosis

J. Form. Med. Associat. **99**, 166-169

ZANETTI, F.; VAROLI, O.; STAMPI, S.; DE LUCA, G. (1996)

Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin

Int. J. Food Microbiol. **33**, 315-321

9 Anhang

Nährmedien für die mikrobiologische Untersuchung

Nährbödenherstellung

Die im Folgenden beschriebenen Nährmedien wurden in der Nährbodenküche des Institutes für Lebensmittelhygiene aus im Handel erhältlichen Trockennährböden hergestellt. Die Herstellung erfolgte mit Aqua dest. aus der hauseigenen Aufbereitungsanlage in Ansätzen von je 1 Liter bzw. 5 Liter bei Peptonwasser. Nach dem Autoklavieren der angesetzten Medien wurden sie im Wasserbad auf 45 – 50°C abgekühlt und in sterile Petrischalen ca. 2 mm dick gegossen. Die Petrischalen wurden mit Herstellungsdatum und Nährbodenbezeichnung etikettiert und in Kunststoffbeuteln im Nährbodenkühlraum aufbewahrt. Vor dem Einsatz im Labor unterlag jede Charge einer Qualitätskontrolle bezüglich pH-Wert, Nährbodenbeschaffenheit und Sterilitätstest. Unmittelbar vor der Beimpfung wurden die Plattenmedien vorgetrocknet (Raumtemperatur oder 15 min im 42°C Brutschrank). Nach dem Aufbringen des Probenmaterials erfolgte die dem Zielorganismus des Mediums entsprechende Inkubation.

Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Peptonwasser, gepuffert

Die Nährstoffzusammensetzung ermöglicht eine Wiederbelebung subletal geschädigter Bakterienzellen und dient somit als Voranreicherung von Bakterien, speziell von *Enterobacteriaceae*, aus dem Probenmaterial.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton	10,00
Natriumchlorid	5,00
Dinatriumhydrogenphosphat	3,50
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50

pH 7,2 +/- 0,2

Inkubation: 16-20 h bei 37°C

Peptonwasser mit Agarzusatz (PW)

Verdünnungslösung

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein, tryptisch	1,00
Natriumchlorid	8,50
Agar-Agar	0,75
pH 7,0 +/- 0,2	

Plate-Count-Agar (PC)

Nährboden ohne Hemmstoffzusatz zur Ermittlung der aeroben Gesamtkeimzahl

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	5,00
Hefeextrakt	2,50
Glucose	1,00
Agar-Agar	14,00
pH 7,0 +/- 0,2	

Inkubation: 72 +/- 2 h bei 30°C

Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS-Agar) (LA)

Selektiver Nährboden zum Nachweis von aerob wachsenden Milchsäurebakterien

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	10,00
Fleischextrakt	10,00
Hefeextrakt	4,00
D(+)-Glucose	20,00
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,00
Tween 80	1,00
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,00
Natriumacetat	5,00
Magnesiumsulfat	0,20
Mangansulfat	0,04
Agar-Agar	14,00

pH 5,7 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 30°C, aerob

Sorbinsäure-Agar (LS)

Selektives Nährmedium zum Nachweis von säuretoleranten Lactobazillen, die Rezeptur gleicht der des MRS-Agars, darüber hinaus werden 0,4 g Sorbinsäure je l Agar zugefügt.

pH 5,0 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob

Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP) (Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar nach KIELWEIN, Basis)

Selektivagar (Glutamat und Stärke als Nährgrundlage) zur Detektion von Pseudomonaden (Kolonien blau-violett) und Aeromonaden, wobei beim Wachstum von Aeromonaden ein Farbumschlag des Indikators Phenolrot nach gelb erfolgt, da Aeromonaden Stärke unter Säurebildung abbauen.

Zusammensetzung (g/l):

Stärke, löslich	20,00
Natrium-L(+)-glutamat	10,00
Kaliumdihydrogenphosphat	2,00
Magnesiumsulphat	0,50
Phenolrot	0,36
Penicillin-G-Natrium	100.000 I.E.
Agar-Agar	12,00

pH 7,2 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 30°C

Bengalrot-Chloramphenicol-Agar (Rose-Bengal-Chloramphenicol) (RO)

Selektives Medium zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen mit Chloramphenicol als Hemmsubstanz gegen Bakterienwachstum.

Zusammensetzung (g/l):

Mycologisches Pepton	5,00
Glucose	10,00
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,00
Magnesiumsulfat	0,50
Bengalrot	0,05
Agar-Agar	15,50
Chloramphenicol-Supplement:	2 Röhrchen à 50,00 mg, jeweils gelöst in 3 ml Ethanol

pH 7,2 +/- 0,2

Inkubation: 96 +/- 2 h bei 25°C

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (Violet Red Bile Dextrose) (VRBD oder VG) nach Mossel

Agar zum selektiven Nachweis von *Enterobacteriaceae*, alle Enterobacteriaceae erscheinen als rote Kolonien, da sie Glucose unter Säurebildung abbauen (Indikatorumschlag); die Substanzen Kristallviolett und Gallensalze hemmen die Begleitflora.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Fleisch	7,00
Hefeextrakt	3,00
Natriumchlorid	5,00
Glucose	10,00
Neutralrot	0,03
Gallesalzmischung	1,50
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,00

Zubereitung:

pH 7,3 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar (Violet Red Bile Agar, VRB) nach Davis

Medium zum selektiven Nachweis von Coliformen Keimen, bei Abbau von Laktose unter Säurebildung erfolgt ein Farbumschlag nach Rot (Lactose-positive *Enterobacteriaceae*, Coliforme und *E. coli*), Lactose-negative *Enterobacteriaceae* erscheinen als farblose Kolonien; als hemmende Substanzen dienen Kristallviolett und Gallensalze.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Fleisch	7,00
Hefeextrakt	3,00
Natriumchlorid	5,00
Lactose	10,00
Neutralrot	0,03
Gallesalzmischung	1,50
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,00

Zubereitung:

pH 7,4 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 30°C, anaerob

Hirn-Herz Bouillon (BHI)

Kulturmedium nach ROSENOW zur Anzucht verschiedener, anspruchsvoller Keime sowie von Staphylokokken zum anschließenden Koagulasetest.

Zusammensetzung (g/l):

Nährsubstrat (Hirn-Extrakt, Herz-Extrakt und Peptone)	27,5
D(+)-Glucose	2,00
Natriumchlorid	5,00
Dinatriumhydrogenphosphat	2,50

pH 7,4 +/- 0,2

Inkubation: 24-48 h bei 37°C, aerob

Baird-Parker-Nährboden-Basis (Staphylokokken Selektivagar Basis nach BAIRD-PARKER)

Selektives Medium zur Detektion von Staphylokokken, durchscheinende Hofbildung um die Staphylokokken Kolonien durch Proteo- und Lipolyse, bei Reduktion von Tellurit zu Tellurium erscheinen die Kolonien schwarz.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	10,0
Fleischextrakt	5,00
Hefeextrakt	1,00
Natriumpyruvat	10,0
Glycine	12,0
Lithiumchlorid	5,00
Agar-Agar	15,0
Eigelb-Tellurit Emulsion	50 ml

pH 6,8 +/- 0,2

Inkubation: 24-48 h bei 37°C, aerob

PALCAM Listeria Nährboden Basis (PALCAM Listeria Selektiv Agar Basis nach VAN NETTEN et al.) (PAL)

Selektivagar zur Isolation von *Listeria monocytogenes*, das Supplement erzeugt die Selektivität, die Umsetzung von Aesculin zu Aesculitin in Verbindung mit Eisen(III)-Ionen bewirkt eine schwarze Verfärbung, charakteristisch sind dunkle Kolonien mit schwarzen Hof.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton	23,0
Hefeextrakt	3,00
Stärke	1,00
Natriumchlorid	5,00
Agar-Agar	13,0
D(-)mannitol	10,0
Ammonium Eisen (III) Citrat	0,50
Aesculin	0,80
Glucose	0,50
Lithiumchlorid	15,0
Phenolrot	0,08

PALCAM Listeria Selektiv Supplement nach VAN NETTEN et al. (mg/Einheit):

Polymixin-B-Sulfat	5,00
Ceftadizim	10,0
Acriflavin	2,50

pH 7,2 +/- 0,2

Inkubation: 48 +/- 2 h bei 37°C, aerob

Zitrat-Azid-Tween-Karbonat Selektivnährboden (ZATK)

Selektivagar zum Nachweis von Enterokokken, diese reduzieren das 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan, die Kolonien erscheinen rötlich, Hemmung der Begleitflora durch Citrat und Acid.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	15,0
Hefeextrakt	5,00
Kaliumdihydrogenphosphat	5,00
Natriumcitrat	15,0
Tween®80	1,00
Agar-Agar	15,0
Natriumcarbonat	2,00
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	0,10
Natriumacid	0,40

pH 7,0 +/- 0,2

Inkubation: 24 h bei 37°C, aerob

Fluorocult ECD Agar (E. coli Direct Agar)

Selektivmedium zum Nachweis von *Escherichia coli*, unter UV-Licht ist eine hellblaue Fluoreszenz der Kolonien sichtbar.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	20,0
Lactose	5,00
Natriumchlorid	5,00
Gallensalze	1,50
Di-Kaliumhydrogenphosphat	4,00
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50
Agar-Agar	15,0
Tryptophan	1,00
4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronid	0,07

pH 7,0 +/- 0,2

Inkubation: 18-24 h bei 44°C, aerob

Glutamat-Nährlösungs-Basis

Zur Resuscitation von *E. coli* Zellen, die durch die Lebensmittelbearbeitung subletal geschädigt sind.

Zusammensetzung (g/l):

Lactose	10,0
Natriumformiat	0,25
L-Cystin	0,02
L-Asparaginsäure	0,024
L-Arginin	0,02
Thiamin	0,001
Nikotinsäure	0,001
Panhotensäure	0,001
Magnesiumsulfat	0,10
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,01
Calciumchlorid	0,01
Dikaliumhydrogenphosphat	0,90
Bromkresolpurpur	0,01
Zusatz zu der Glutamat-Nährlösungs-Basis:	
Natriumglutamat	0,01
Ammoniumchlorid	3,2
Agar-Agar	16,0

pH 6,7 +/- 0,1

Auf den Nährboden wird ein Celluloseacetat-Membranfilter aufgelegt und dieser dann mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft und 4 h bei 37°C aerob bebrütet.

Tryptose-Sulfit-Cycloserin (TSC) Agar

Selektivmedium zum Nachweis von *Clostridium perfringens* einschließlich Sporen; Schwarzfärbung der Kolonien, die Schwefelwasserstoff produzieren, durch Reaktion mit Sulfit und Eisensalz.

Zusammensetzung (g/l):

Tryptose	15,0
Pepton aus Sojamehl	5,00
Hefeextrakt	5,00
Natriumdisulfit	1,00
Ammonium Eisen(III)citrat	1,000
Agar-Agar	15,0
Zusätzlich:	
Cycloserin	4,00

pH 7,6 +/- 0,2

Inkubation: 18-24 h bei 37°C, anaerob

***Bacillus-cereus*-Selektivnährboden (Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar, PEMBA)**

Selektivagar zur Detektion von *Bacillus cereus*, die Mannit Verstoffwechslung erzeugt einen Farbumschlag des pH-Indikators Bromthymolblau (bläuliche Kolonien), das Pepton in Verbindung mit dem Natriumpyruvat bewirkt eine Eigelb-Präzipitation um die Kolonien.

Zusammensetzung (g/l):

Pepton	1,00
Mannit	10,0
Natriumchlorid	2,00
Magnesiumsulfat	0,10
Dinatriumhydrogenphosphat	2,50
Kaliumdihydrogenphosphat	15,0
Bromthymolblau	0,12
Natriumpyruvat	10,0

Zusätzlich:

Bacillus-Cereus-Selektiv-Supplement

Polymyxin B 50000 IE, gelöst in 2 ml A. dest.

Eigelb Emulsion 25 ml

pH 7,2 +/- 0,2

Inkubation: 18-24 h bei 37°C, aerob

Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung

Selektivanreicherung für Salmonellen

Zusammensetzung (g/l):

Sojapepton	5,00
Natriumchlorid	8,00
Kaliumdihydrogenphosphat	0,75
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	40,0
Malachitgrün	0,04

Zubereitung:

pH 5,2 +/- 0,2

Inkubation: 24 h bei 42°C +/- 1°C, aerob

Selenit-Cystin-Lösung

Anreicherungsmedium für Salmonellen

Zusammensetzung (g/l):

Selenit-Cystin-Basislösung

Caseinpepton	5,00
Lactose	4,00
Dinatriumhydrogenphosphat	10,0
L-Cystin	0,01

sowie

Natriumbiselenit 4,0 g, gelöst in 1,0 l A. dest.

pH 7,0 +/- 0,2

Inkubation: 18-24 h bei 36°C, aerob

Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose Agar

Selektivnährboden zur Isolation von Salmonellen, die Kolonien stellen sich pinkfarben dar, da weder Laktose noch Saccharose verstoffwechselt werden, dies würde mit einem Farbumschlag nach gelb einhergehen (Indikator Phenolrot), Hemmung von gram-positiver Begleitflora durch Brilliantgrün

Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Fleisch	5,00
Pepton aus Casein	5,00
Fleischextrakt	5,00
Natriumchlorid	3,00
Dinatriumhydrogenphosphat	2,00
Lactose	10,0
Saccharose	10,0
Phenolrot	0,08
Brilliantgrün	0,0125
Agar-Agar	12,0

Zubereitung:

pH 6,9 +/- 0,2

Inkubation: 24 h bei 37°C, aerob

Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)

Nährmedium zur Detektion von Salmonellen und Shigellen; Shigellen verstoffwechseln keine Xylose (kein Farbumschlag) im Gegensatz zu Salmonellen, die weiterhin Lysin decarboxylieren und sich somit als rote oder orange Kolonien mit schwarzen Zentrum (Schwefelwasserstoffbildung) auf dem roten Nährboden darstellen

Zusammensetzung (g/l):

Hefeextrakt	3,00
Lysin	5,00
Xylose	3,75
Natriumchlorid	5,00
Natriumdesoxycholat	1,00
Lactose	7,50
Saccharose	7,50
Phenolrot	0,08
Natriumthiosulfat	0,0125
Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,80
Agar-Agar	12,5

Zubereitung:

pH 7,4 +/- 0,2

Inkubation: 18-24 h bei 37°C, aerob

Karmali-Selektivnährboden

Blutfreier Selektivagar für die Anzucht von *Campylobacter* spp. mit Karmali-Selektivsupplement zur Hemmung der Begleitflora.

Zusammensetzung (g/l):

Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Aktivkohle	4,0
Hämin	0,032

Karmali-Selektivsupplement (2 Röhrchen/Liter, gelöst in 2 ml Ethanol):

Natriumpyruvat	0,1
Cefoperazon	0,032
Vancomycin	0,02
Amphotericin B	0,01

pH-Wert bei 25 °C: 7,4 ± 0,2

Inkubation: mikroaerob, 5 Tage bei täglicher Kontrolle, 42°C

Preston-Selektivanreicherungsmedium

Selektiver Nährboden mit Pferdeblut zum Nachweis von *Campylobacter* spp. unter Zusatz von Campylobacter-Selektiv-Supplement zur Hemmung der Begleitflora.

Zusammensetzung (g/l):

Fleischextrakt „Lab-Lemco“	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	12,0
Campylobacter-Selektiv-Supplement (2 Röhrchen/Liter, gelöst in 2 ml Ethanol)	
Polymyxin B	2500 IE
Rifampicin	0,011
Trimethoprim	0,0011
Cycloheximid	0,113
Pferdeblut, lysiert	50 ml

pH-Wert bei 25 °C: 7,5 ± 0,2

Inkubation: mikroaerob, 5 Tage bei täglicher Kontrolle, 42°C

Tabelle 17: Inkubationsbedingungen der verwendeten Nährböden

Bebrütungs- temperatur	Nährboden	Zielkeim	Bebrütungsdauer			
			Stunden			
30°C	PC	mesophile aerobe Gesamtkeimzahl				72±2
30°C	LA	aerob wachsende Milchsäurebakterien			48±2	
30°C, anaerob	LS	Laktobazillen			48±2	
30°C	GSP	Aero-/Pseudomonaden			48±2	
37°C	BP	koagulase-positive Staphylokokken, Mikrokokken			46±2	
37°C	PAL	<i>L. monocytogenes</i>			48±2	
37°C, anaerob	TSC	<i>C. perfringens</i> / sulfitred. Anaerobier		22±2		
37°C	PEMBA	<i>B. cereus</i>		22±2		
42°C	ZATK	Enterokokken			46±2	
30°C, anaerob	VG	Enterobakteriäzen			48±2	
30°C, anaerob	VL	Coliforme			48±2	
37°C	GLUTA	<i>E. coli</i>	4			
44°C	ECD	<i>E. coli</i>		16- 18		
37°C	ENDO	<i>E. coli</i>		24±2		
37°C	BPLS	Salmonellen		22±2		
37°C	XLD	Salmonellen		22±2		
25°C	RO	Hefen u. Schimmelpilze				4 d

Danksagung

Zu allererst danke ich von Herzen Prof. Dr. Goetz Hildebrandt. Zum einen für die Überlassung dieses interessanten Themas, insbesondere aber für die langjährige, geduldige, vor allem aber hochqualifizierte Unterstützung, wissenschaftliche Anregung, Ratschläge und Förderung sowie die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Dr. Josef Kleer für viele anregende Diskussionen, der diesem Thema eine besondere wissenschaftliche Ambition entgegenbrachte und jederzeit bereit war, sein großes, insbesondere mikrobiologisches Wissen in dieses Projekt einzubringen.

Wesentlich zum Gelingen beigetragen hat das gesamte Team vom Institut für Lebensmittelhygiene der FU Berlin, herzlichen Dank an euch alle! Insbesondere an Christel Galla, die mir bei dem molekularbiologischen Teil zur Seite stand und Brigitte Müller für ihre Unterstützung in der Mikrobiologie. Aufmunternd und immer mit offenem Ohr war mir Heike Zilm eine wertvolle Begleiterin in meiner Zeit am Institut.

Ohne euch, liebe Freunde, wäre es kaum möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen. Dabei danke ich insbesondere Angelika und Martin Pfohl, Christine Brechtel, Katrin Rauscher und Ute Pelz, deren hartnäckiges Nachhaken sich ohne Frage als maßgeblich für den Abschluss meiner Dissertation erwies.

Dir, lieber Bernhard, herzlichen Dank für deine Unterstützung, in dem du unter anderem Übellaulingkeit ertragen und viele gemeinsame Stunden an das Projekt abgetreten hast.

Zum Abschluss danke ich in diesem Teil der Dissertation ganz herzlich all denen, wenn auch nicht namentlich erwähnt, aus Familie, Beruf und Freundeskreis, die mich über die Zeit meiner Promotion mit all ihren Höhen und Tiefen in fachlichen und auch persönlichen Belangen unterstützt haben und somit ihren Teil zum Gelingen beigetragen haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und allein unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen erarbeitet und verfasst habe.
- dass ich weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe.
- dass mir die Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin vom 27. Oktober 1998, in Verbindung mit § 70 Abs. 5 des Gesetzes über die Hochschulen im Land Berlin (Berliner Hochschulgesetz – BerlHG) in der Fassung der Bekanntmachung der Neufassung vom 13. Februar 2003 (GVBl. S. 81), zuletzt geändert durch Gesetz vom 6. Juli 2006 (GVBl. S. 713) mit den Ergänzungen vom 26. Januar 2000 und 29. November 2000 bekannt ist.

Angela Stubbe
Berlin, den 05.05.2011