

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Arbeitsgeräte**

Erforderlich war ein mikrobiologisches Labor mit üblicher Ausstattung (Impfösen, Pinzetten, Pipetten, Pipettenspitzen, Tubes, Scheren, Glaswaren, Bunsenbrenner, Rüttler, Waagen, Mikroskop, Kühlschränke, Brutschränke, Sterilisator).

##### **3.1.1.1 Arbeitsgeräte zur Probennahme**

Für die Entnahme der Masthähnchendarmkonvolute wurden Stomacherbeutel (Meintrup DWS Laborgeräte GmbH, Modell SEWARD BA 6041) und sterile Einmalhandschuhe (Flexam, Allegiance) verwendet. Die Proben wurden in Kühlboxen, gekühlt mit Kühlakkus, zum Labor transportiert.

##### **3.1.1.2 Arbeitsgeräte zur Probenaufbereitung und mikrobiologischen Untersuchung**

Für die Probenaufbereitung und die mikrobiologische Untersuchung wurden zusätzlich sterile Einmalösen (Greiner Bio- One, Art. Nr. 731170), ein Stereomikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss, Mikroskop Axioskop, 130Va Typ B), eine elektronische Präzisionswaage (Sartorius, AC 121S), ein Wasserbad (Mettler), Anaerobiertöpfe (Becton Dickinson, BBL™ GasPak™ Anaerobic Systems) mit Gasentwicklern (Becton Dickinson, CampyPakPlus™, Art. Nr. 271045), Kühl- Brutschränke (Heraeus, BK 6160), ein begasbarer Brutschrank (WTB Binder) und Tiefkühlschränke (Heraeus, HFU 586), in denen die *Campylobacter*- Isolate bei -80°C aufbewahrt wurden, benutzt.

##### **3.1.1.3 Arbeitsgeräte für die Antibiotika- Resistenz- Testung**

Für die Antibiotika- Resistenz- Testung waren außerdem Mikrotiter- Platten (Sensititre Ltd., NLV 37), eine Arbeitsstation mit mikroaerober Werkbank (Meintrup DWS, MACS VA 500), ein Sensititre Autoinokulator (Sensititre Ltd., INO2 117R09 N22) mit Sensititre Zubehör (Dosierköpfe, durchlöchernte Klebefolie) und ein Sensititre Sensitouch System (Sensititre Ltd., St02 119R02 N01) nötig.

##### **3.1.1.4 Arbeitsgeräte für die Multiplex- PCR und AFLP- Analyse**

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden zusätzlich eine UV- Werkbank (Heraeus, Typ HS12), ein Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp 9600), ein Mastercycler gradient (Eppendorf), ein Gelelektrophorese- System Mini- Sub- Cell GT (Bio- Rad, Art.- Nr.: 1704467), ein Thermo- Schüttler (Eppendorf, Thermomixer comfort

5355), eine Elektrophorese- Kammer (Bio Rad, Mini- Sub<sup>®</sup> Cell GT), eine Kamera mit UV- bzw. Weiß- Licht und ein Dokumentationsgerät (Vilbert Laurmat, Bio- Print Dokumentations- System) sowie Tiefkühlschränke (Bosch, economic- froster- super) zur Lagerung der Proben bei -20°C verwendet.

Für die AFLP- Analyse wurden zudem ein Spektralphotometer (Synergy HT, Bio- Tek Instruments GmbH) mit entsprechender Software (KC4, Version 3.4), eine Elektrophorese- Kammer (Pharmacia Biotech, Elektrophoresis Power Supply EPS 3500), eine Färbevorrichtung (Pharmacia Biotech, Hoefer Automated Gel Stainer, Multi Temp III, Multi Phor II), Gel- Fix<sup>®</sup>- Folie (Serva) und eine Software zur Auswertung (Bionumerics, Version 3.5) benötigt.

### 3.1.2 Medien für mikrobiologische Arbeiten

#### 3.1.2.1 Preston- Bouillon

<u>Basis: Nährbouillon Nr. 2; Oxoid CM 67</u>	<u>25 g/L</u>
Fleischextrakt „Lab Lemco“	10 g
Pepton	10 g
Natriumchlorid	5 g
<u>Anreicherungs- Supplement, Oxoid SR232E</u>	<u>2 Flaschen</u>
Dosen pro Flasche:	
Natriumpyruvat	125 mg
Natriummetabisulfit	125 mg
Eisen(II)- sulfat	125 mg
<u>Hemstoff: <i>Campylobacter</i>- Selektiv- Supplement; Oxoid SR204</u>	<u>2 Flaschen</u>
Dosen pro Flasche:	
Polymyxin	2500 IE
Rifampicin	5 mg
Trimethoprim	5 mg
Amphotericin B	5 mg
<u>Zusatz: lysiertes Pferdeblut; Oxoid SR48</u>	<u>50 ml</u>

pH- Wert: 7,5/25°C; Toleranz: 0,2

25 g Basispulver wurden in einem Liter Aqua bidest. unter Rühren vollständig suspendiert. Der Ansatz wurde bei 121°C für 15 Minuten im Autoklaven sterilisiert. Die Basis wurde kurz aufgerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Der pH- Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert.

Das Supplement (toxisches Lyophilisat) wurde laut Packungsbeilage aseptisch gelöst, und die erforderliche Menge Pferdeblut wurde aseptisch abgemessen. Beide Zusätze wurden nacheinander unter sterilen Bedingungen der Nährmedium- Basis unter leichtem Rühren zugesetzt. Der pH- Wert wurde kontrolliert und gegebenenfalls

korrigiert. Die Bouillon wurde dann steril in die gewünschten Endgefäße abgefüllt. Die gebrauchsfertige Bouillon war blutrot.

### **3.1.2.2 *Brucella- Bouillon***

Brucella Broth, DIFCO 0495-17 28 g/L

---

Tryptone	10 g
Peptamin	10 g
Dextrose	1 g
Hefeextrakt	2 g
Natriumchlorid	5 g
Natriumbisulfit	0,1 g

pH- Wert: 7,0/25°C, Toleranz: 0,2

Die abgewogene Trockensubstanz wurde in einem Liter Wasser unter Rühren zur Lösung gebracht. Der pH- Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Bouillon wurde in die Endgefäße abgefüllt und verschlossen und anschließend 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Zur Abkühlung wurden die Gefäße einige Stunden bei Raumtemperatur belassen. Der pH- Wert wurde erneut kontrolliert. Die gebrauchsfertige Bouillon war klar und gelblich.

### **3.1.2.3 *Mueller- Hinton- Bouillon***

Mueller Hinton Broth, BBL 212322 22 g/L

---

Rindfleischextrakt	3,0 g
Caseinhydrolysat	17,5 g
Stärke	1,5 g

pH- Wert: 7,3/25°C, Toleranz: 0,1

Die abgewogene Trockensubstanz wurde in einem Liter Wasser unter Rühren zur Lösung gebracht. Der pH- Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Bouillon wurde in die Endgefäße abgefüllt und verschlossen und anschließend 10 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Zur Abkühlung wurden die Gefäße einige Stunden bei Raumtemperatur belassen. Der pH- Wert wurde erneut kontrolliert. Die gebrauchsfertige Bouillon war klar und gelblich.

### 3.1.2.4 Karmali- Agar

Basis: *Campylobacter*- Agar- Basis nach KARMALI, blutfrei, OXOID CM935 43 g/L

Columbia- Agar- Basis	39 g
Aktivkohle	4 g
Hämatin	32 mg

Hemmstoff: *Campylobacter*- Selektiv- Supplement, OXOID SR205E 2 Flaschen

Dosen pro Flasche:

Natriumpyruvat	50 mg
Cefoperazon	16 mg
Vancomycin	10 mg
Amphotericin B	5 mg

pH- Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2

Das abgewogene Basissubstrat wurde in der Hälfte der vorgesehenen Wassermenge angeschlämmt und unter Rühren 10 Minuten quellen gelassen. Dann wurde das restliche Wasser hinzugegeben. Der Ansatz zur Lösung des Agars wurde für wenige Minuten im Dampfkochautomat aufgekocht und danach kräftig aufgerührt. Der pH-Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Basis wurde für 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.

Die Supplemente wurden laut Packungsbeilage unter der Werkbank gelöst. Dann wurde diese Lösung dem temperierten Basis- Nährmedium aseptisch unter leichtem Rühren zugesetzt. Der pH- Wert wurde kontrolliert. Anschließend wurden ca. 15 ml des Nährmediums in Platten gegossen und diese zur Erstarrung und Akklimatisation einige Stunden stehen gelassen. Der gebrauchsfertige *Campylobacter*- Agar nach KARMALI war schwarz.

### 3.1.2.5 Mueller- Hinton- Blut- Agar

Basis: Mueller- Hinton- Nährboden, OXOID CM337 38 g/L

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g	2,0 g
Caseinhydrolysat	17,5 g
Stärke	1,5 g
Agar Agar	17,0 g

Zusatz: Schafblut 50 ml

pH- Wert: 7,4/25°C, Toleranz: 0,2

Das abgewogene Basissubstrat wurde in Aqua bidest. unter Rühren suspendiert. Der Ansatz zur Lösung des Agars wurde im Dampfkochapparat aufgekocht und danach kräftig aufgerührt. Der pH- Wert wurde gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Basis wurde für 15 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.

Nach Abkühlen der Basis auf 45-50°C wurde die aseptisch abgemessene Menge Schafblut dem Nährmedium unter leichtem Rühren zugesetzt. Anschließend wurden ca. 15 ml des Nährmediums in Platten gegossen und diese zur Erstarrung und Akklimatisation einige Stunden stehen gelassen. Die gebrauchsfertigen Mueller-Hinton- Blut- Agar -Platten waren kirschrot.

### 3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

#### 3.1.3.1 Reagenzien/Chemikalien für Probenaufbereitung und mikrobiologische Arbeiten

Substanz	Firma	Artikel- Nummer
Aceton	Merck	1.00013.1000
Cephalothin- Blättchen (KF 30 µg)	Oxoid	CT 0010B
Indoxyl- Acetat	Sigma	I-3500
Natriumchlorid	Roth	9265
Natriumsalz der Hippursäure	Merck	8.20648
Nalidixinsäure- Blättchen (NA 30 µg)	Oxoid	CT 0031B
Ninhydrin	Merck	6762
Karbol- Fuchsin- Lösung	Merck	1.09215
Karbol- Gentianaviolett- Lösung	Merck	1.09218
Lugolsche Lösung	Merck	1.09261
Papierblättchen	Schleicher&Schuell	2668
Wasserstoffperoxid	Merck	1.08600

#### 3.1.3.2 Reagenzien/Chemikalien für die Multiplex- PCR

Substanz	Firma	Artikel- Nummer
Agarose Molecular Grade	Bioline	BIO41025
Aqua bidest.		
Bromphenolblau	VWR	1.08122.0005
Chelex <sup>®</sup> 100 Resin	Bio Rad	1422832
dNTP- Mix (10 mM)	Bioline	BIO39054
EDTA	Merck	1.12029.0100
Eisessig	Merck	818755
Ethidiumbromid- Lösung (1%ig)	VWR	1.11608.0030
Ficoll 400	Sigma- Aldrich	F4375
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Bioline	BIO21040
Natriumchlorid	Roth	9265
Primer	Bio Tez	
Taq- Polymerase	Bioline	BIO21040
Tris	VWR	1.08418.1000
100 bp- Größenmarker Hyperladder IV	Bioline	BIO33030
10xReaktionspuffer	Bioline	BIO21040

#### *3.1.3.2.1 Agarosegel*

Zur Herstellung eines 3%igen Agarosegels wurden 6 g Agarose in eine 500 ml Glasflasche abgewogen und auf 200 ml mit TAE- Puffer aufgefüllt. Das Ganze wurde dann in der Mikrowelle so lange aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren und anschließend für ca. 20 min im 56°C heißen Wasserbad abgekühlt. Ca. 60 ml von dem noch flüssigen Gel wurden in eine Gelkammer gegossen und zwei Gelkämme mit je 15 Zähnen ins Gel gehängt. Das restliche Flüssigel wurde im Wasserbad belassen, um später weitere Gele zu gießen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämme entfernt und das Gel zur Gelelektrophorese benutzt.

#### *3.1.3.2.2 Ladepuffer*

10 ml 15%iges Ficoll 400 wurde durch leichtes Erhitzen in Aqua bidest. gelöst. Nach Zugabe von 0,25 ml 5%iger Bromphenolblau- Lösung (gelöst in TAE- Puffer) wurde das Ganze gut gemischt, mit Aqua bidest. 1:4 verdünnt, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt.

#### *3.1.3.2.3 50X Tris- Acetat- EDTA (TAE)- Puffer*

242,5 g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt und gut gemischt. Für den Gebrauch wurde diese Lösung mit Aqua bidest. 1:50 verdünnt.

#### *3.1.3.2.4 Ethidiumbromid- Färbe- Lösung*

0,5 ml Ethidiumbromid- Lösung wurden mit 1 Liter Aqua bidest. gemischt und dunkel unter dem Abzug aufbewahrt. Bei der Herstellung und dem Umgang mit dieser Lösung wurden immer Handschuhe getragen, da Ethidiumbromid als kanzerogen und mutagen gilt.

### 3.1.3.3 Reagenzien/Chemikalien für die AFLP

Substanz	Firma	Artikel- Nummer
Aqua bidest.		
DNA Silver Staining Kit	Amersham Biosciences	17600030
Dneasy Tissue Kit	Quiagen	69506
Di-Thio- Threitol (DTT)	Amersham Biosciences	US15397
EDTA, Titriplex III	Merck	1.12029.0100
Excelgel DNA Analysis Kit	Amersham Biosciences	17119807
HCl	Merck	100317
<i>HhaI</i>	BioLabs	R0139L
<i>HindIII</i>	BioLabs	R0104S
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Q- Biogene	EPMGCL25
peqGOLD DNA- Sizer XII	peqLab	252160
Primer, Adapter	Bio Tez	
Rnase A	Roche	10109169
Tris	VWR	1.08418.1000
T4 DNA Ligase	BioLabs	M0202L
Xylencyanol	Serva	38505.01
1.1xReddyMix PCR MM	ABgene	AB0575LD/B

#### 3.1.3.3.1 Tris- EDTA (TE)- Puffer

10 mM Tris- HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) wurden mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt und gut gemischt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Probennahme**

Über einen Zeitraum von Mai 2004 bis Juli 2005 wurden 278 Masthähnchenherden verschiedener Haltungssysteme (Konventionelle Haltung: 217 Herden von 60 Mastbetrieben, Louisiana- Ställe: 21 Herden von 2 Mastbetrieben, Freilandhaltung: 24 Herden von 9 Mastbetrieben, Biologische Haltung: 16 Herden von 4 Mastbetrieben) beprobt. Dabei wurden 181 Herden als Poolproben und 229 Herden als Einzelproben untersucht, wobei 132 Herden sowohl als Pool- als auch als Einzelproben untersucht wurden.

Je eine Schlachtpartie (definierte Anzahl an Hähnchen, die in derselben Herde gemästet und in einer Lieferung zu einem Schlachthof transportiert wurde) von jedem Mäster wurde soweit möglich einmal im Halbjahr (Sommerhalbjahr: Mai bis Oktober, Winterhalbjahr: November bis April) als Poolprobe untersucht.

In vier Geflügelschlachthöfen wurden im Verlaufe der Schlachtier- und Fleischuntersuchung pro Herde 10 ganze Darmkonvolute mit intakten Blinddärmen vom amtlichen Tierarzt oder dem Untersuchungspersonal entnommen. Die Darmkonvolute wurden in sterile Stomacherbeutel gepackt und mit dem Namen des Mästers, dem Probennahmedatum und dem Schlachtalter versehen. Die Proben wurden sofort gekühlt und gelangten gekühlt spätestens innerhalb von drei Tagen in das Untersuchungslabor des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR), Berlin.

### **3.2.2 Probenaufbereitung**

Die Proben wurden in Anlehnung an die ISO 10272 (1995) aufgearbeitet. Zehn Blinddarmpaare einer Herde wurden mit einer sterilen Schere eröffnet, hierzu wurden die Köpfe der Blinddärme abgetrennt. Mit einer sterilen Einmalöse wurde Blinddarminhalt von jedem Blinddarmpaar entnommen und bei der Einzelbeprobung in je 10 ml Preston- Bouillon überführt. Bei den Poolproben wurden die 10 Einzelproben in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml Preston- Bouillon gegeben. Die Gefäße wurden gasdurchlässig verschlossen und unter mikroaeroben Bedingungen (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>) für 24h (+/- 1h) bei 42°C bebrütet.

### 3.2.3 Kultivierung und Isolierung

Abbildung 4 zeigt das Fließschema des mikrobiologischen Untersuchungsganges. Eine Impföse (ca. 10 µl) der bebrüteten Preston- Bouillon wurde auf einer Platte Karmali- Agar ausgestrichen und über 48h bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Koloniematerial einer *Campylobacter*- verdächtigen Kolonie wurde auf Mueller- Hinton- Blut- Agar überimpft und für 24 bzw. 48h bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Koloniematerial vom 24h- Mueller- Hinton- Blut- Agar wurde in 5 ml Brucella- Bouillon überführt und für 24h bei 42°C mikroaerob bebrütet. Koloniematerial der gewonnenen Reinkultur wurde zur Identifizierung und Differenzierung herangezogen.

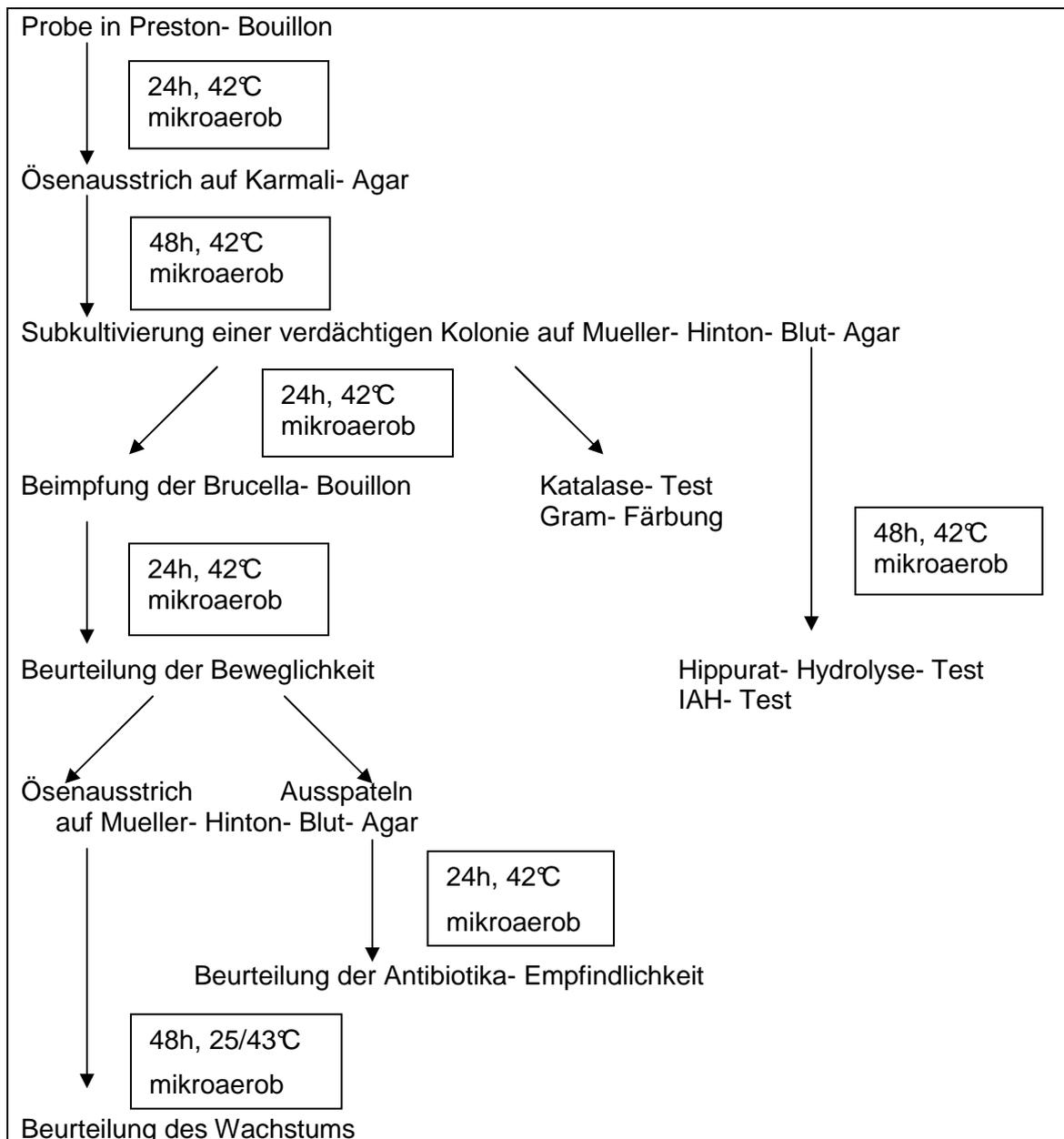


Abb. 4: Untersuchungsgang zur Isolierung und Differenzierung von thermophilen *Campylobacter* spp.

### 3.2.4 Phänotypische Differenzierung

#### Katalase- Test

Von der 24h- Mueller- Hinton- Blut- Agarplatte wurde Koloniematerial mit einer Impföse auf einen Objektträger gebracht und mit 3%igem Wasserstoffperoxid überschichtet. Durch die Katalase wurde Sauerstoff freigesetzt, was sich in einer Bläschenbildung zeigte.

#### Gram- Verhalten

Koloniematerial von der 24h- Mueller- Hinton- Blut- Agarplatte wurde auf einem Objektträger nach Gram gefärbt, dabei zeigten *Campylobacter* spp. ein gram-negatives Verhalten (Rotfärbung).

#### Beweglichkeit

Zur Beurteilung der Beweglichkeit wurde mit einer Impföse ein Tropfen der beimpften Brucella- Bouillon auf einen Objektträger gebracht und unter dem Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Dabei zeigten *Campylobacter* spp. eine schnelle, das Blickfeld durchquerende Bewegung. Auch die korkenzieherartig gewundene Form war hierbei sichtbar.

#### Hippurat- Hydrolyse- Test nach Harvey

Dieser Test diente der Identifizierung von *C. jejuni*. Dazu wurde eine 1%ige Natrium-Hippuratlösung frisch mit sterilem Aqua bidest. hergestellt. Von dieser Lösung wurden 0,4 ml in sterile Reagenzröhrchen gegeben und mit einer Öse Koloniematerial der 48h- Mueller- Hinton- Blut- Agarplatte beimpft, so dass eine sehr trübe Suspension entstand. Die Reagenzröhrchen wurden dann für 2 Stunden bei 37°C in einem Wasserbad bebrütet. Anschließend wurde pro Reagenzröhrchen 0,2 ml Ninhydrin-Reagenz hinzugegeben und die Probe weitere 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Eine positive Reaktion zeigte sich in einer dunkelvioletten Färbung (Hippurat wurde durch die Hippurikase in Benzoessäure und Glyzin aufgespalten, wobei Glyzin durch eine Farbreaktion mit Ninhydrin nachgewiesen wurde).

#### Indoxyl- Acetat- Hydrolyse (IAH)

Zur Herstellung der IAH- Testblättchen wurde 10% Indoxyl- Acetat in Aceton gelöst, und die Papierblättchen darin getränkt und bei Raumtemperatur getrocknet. Koloniematerial der 48h- Mueller- Hinton- Blut- Agarplatte wurde auf einem IAH- Testblättchen verrieben, ein Tropfen Aqua bidest. dazugegeben und die Reaktion nach 15-30 Minuten abgelesen. Ein positiver Befund stellte sich dabei als hell- bis dunkelblauer Farbumschlag dar.

### Wachstum bei 25°C und 43°C

Zur Wachstumskontrolle bei 25°C und 43°C wurde je eine Öse der beimpften Brucella-Bouillon auf Mueller- Hinton- Blut- Agar ausgestrichen und bei der jeweiligen Temperatur für 48h mikroaerob bebrütet. Dabei zeigten *C. jejuni*, *C. coli* und *C.lari* bei 25°C kein Wachstum, während bei 43°C ein Wachstum zu verzeichnen war.

### Nalidixinsäure- und Cephalothin- Empfindlichkeit

Zur Bestimmung der Antibiotika- Empfindlichkeit wurden ca. 0,1 ml der beimpften Brucella- Bouillon auf Mueller- Hinton- Blut- Agar ausgespatelt, mit Antibiotika- Testblättchen bestückt und für 24h mikroaerob bebrütet. Die Ausbildung oder das Fehlen eines Hemmhofes erlaubte die Beurteilung als sensibel oder resistent.

### **3.2.5 Kontrollstämme**

Folgende Bakterienstämme wurden zur Kontrolle der Medien und der biochemischen Reaktionen mitgeführt: *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. jejuni* DSMZ 4689 und *C. lari* DSMZ 11375.

### **3.2.6 Stammhaltung**

Für die Stammhaltung wurden die *Campylobacter*- Reinkulturen in Brucella- Bouillon mit 10% Glycerin auf Glasperlen und in Mikrobank<sup>®</sup>- Systemen bei -80°C tiefgefroren.

### 3.2.7 Antibiotika- Resistenz- Testung ausgewählter Isolate

Alle *Campylobacter*- Poolproben- Isolate wurden als repräsentative Stichprobe einer Antibiotika- Resistenzprüfung mittels Mikrodilution nach Luber et al. (2003a) unterzogen. Dabei wurde das Resistenzverhalten gegenüber Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Ceftazidim, Ciprofloxacin, Erythromycin, Gentamicin, Nalidixinsäure und Tetrazyklin untersucht.

Hierzu wurden die bei -80°C gelagerten *Campylobacter*- Isolate auf Mueller- Hinton- Blut- Agar gebracht und bei 42°C für 48h mikroaerob bebrütet. Anschließend wurden je 5 ml Mueller- Hinton- Bouillon mit einer halben Öse Koloniematerial beimpft und bei 37°C für 24h mikroaerob bebrütet. 150 µl dieser Vor kultur, die ca.  $10^8$  KbE/ml enthielt, wurden in 10 ml Mueller- Hinton- Bouillon überführt. Die Glasröhrchen wurden mit einem Dosierkopf versehen und gut geschüttelt. Mit Hilfe des Sensititre Autoinoculators wurden in jede Kavität der 96er Mikrotiterplatte NLV 37 (Tab. 7) 100 µl des Inokulums, welches ca.  $10^6$ - $10^7$  KbE/ml enthielt, befüllt. Die Platten wurden mit durchlöcherter Folie zugeklebt und bei hoher Luftfeuchtigkeit (85%) bei 37°C für 24h mikroaerob bebrütet. Schlecht wachsende Proben wurden nochmals für 24h bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Die Auswertung der Platten erfolgte mittels Sensititre Sensitouch System. Dabei entsprach die minimale Konzentration einer Substanz, bei der kein Wachstum mehr sichtbar war, dem MHK- Wert. Bei bakteriostatischen Substanzen wie Erythromycin und Tetrazyklin wurde der MHK- Wert bei 80% Wachstumshemmung abgelesen.

Anhand der MHK- Werte konnten die *Campylobacter*- Stämme als sensibel oder resistent gegen ein Antibiotikum eingestuft werden. Zur Festlegung der Grenzwerte wurden die Beurteilungswerte der NCCLS (CLSI) für Enterobacteriaceae bzw. bei Erythromycin für *St. aureus* (2001) herangezogen (Tab. 8). Für die Qualitätskontrolle wurde auf Werte der DIN 58959-13 und -16 bzw. Werte der NCCLS M100-S11 (2001) zurückgegriffen (Tab. 9).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>GEN</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>TET</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>CIP</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031
<b>AMP</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>SAM</b>	128/64	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	=> :2	=> :2	=> :2	=> :2
<b>TAZ</b>	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063
<b>ERY</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	<b>+K</b>
<b>NAL</b>	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	<b>+K</b>

alle Werte in mg/L

 resistent

 sensibel

**+K** Positivkontrolle

GEN Gentamicin

TET Tetracyclin

CIP Ciprofloxacin

AMP Ampicillin

SAM Ampicillin/Sulbactam

TAZ Ceftazidim

ERY Erythromycin

NAL Nalidixinsäure

Tab. 7: Belegung der Sensititre Platte NLV 37

	GEN	TET	CIP	AMP	SAM	TAZ	ERY	NAL
<i>C. jejuni</i>	1-4	0,25-1	0,25-1	1-4	1-4	16-32	1-4	2-8
<i>C. coli</i>	0,25-1	0,5-2	0,5-2	4-16	4-16	16-64	2-8	4-16

Im Rahmen der Methodenstandardisierung in Anlehnung an DIN 58959-13 und -16 ermittelte Qualitätskontrollwerte für die DSMZ *Campylobacter*- Stämme

Tab. 8: Qualitätskontrollwerte für *C. jejuni* DSMZ 4688 und *C. coli* DSMZ 4689

	GEN	TET	CIP	AMP	SAM	TAZ	ERY	NAL
<i>St. aureus</i>	0,12-1	0,25-1	0,12-0,5	0,5-2	-	4-16	0,25-1	-
<i>E. coli</i>	0,25-1	0,5-2	0,004-0,016	2-8	2/-8/4	0,06-0,5	-	1-4

Kontrollwerte nach NCCLS M100-S11 (2001)

Tab. 9: Qualitätskontrolle für die Mueller- Hinton- Bouillon, aerobe Inkubation der Testplatten

### 3.2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten zur Feststellung des Vorkommens und der Antibiotika-Resistenz von *Campylobacter* spp. erfolgte mit dem Programm SPSS, Version 12.0. Einzelne Variablen wurden unter Benutzung des exakten Testes nach Fisher, die Variable "Alter" wurde mit dem U- Test nach Mann und Whitney ausgewertet.

### 3.2.9 Bestätigung der biochemischen Ergebnisse durch Multiplex- PCR

Alle gewonnenen 825 *Campylobacter*- Isolate (79 Poolproben- und 746 Einzelproben- Isolate) wurden neben der biochemischen Differenzierung ebenfalls mittels Multiplex-PCR nach Wang et al. (2002) spezifiziert.

#### 3.2.9.1 DNA- Reinigung

Von der beimpften und für 24h bebrüteten Brucella- Bouillon wurde je 1 ml in sterile Tubes überführt und etwa 10 min im Eis gekühlt, dann bei 13000 rpm für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Pellet wurden 500 µl NaCl- Lösung (0,85%ig) gegeben, das ganze homogenisiert und bei 13000 rpm für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und auf das Pellet wurden 400 µl Chelex®100- Resin- Lösung (5%ig) gegeben und homogenisiert. Die Proben wurden dann für 60 min bei 56°C im Thermoschüttler inkubiert und danach für weitere 15 min bei 95°C. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Bei direkter Weiterverarbeitung wurden die Proben für 5 min auf Eis abgekühlt, ansonsten bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.9.2 Multiplex- PCR

Alle Pipettierschritte wurden in der nachfolgend dargestellten Reihenfolge auf Eis durchgeführt, wobei das Enzym zum Schluss zugegeben wurde. Um mögliche Schwankungen in der Pipettiergenauigkeit zu umgehen, wurde ein Mastermix berechnet, der alle Komponenten außer der DNA für die zu untersuchenden Proben, den Kontrollen (Positiv- Kontrolle: Referenzstämme, Negativ- Kontrolle) sowie einer Zusatzmenge für vier Ansätze enthielt.

Pipettierschema für eine Probe

Aqua bidest.	9,09 µl
10x Reaktionspuffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4,0 µl
dNTP- Mix (10 mM)	1,5 µl
Primermix*	5,4 µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,01 µl

\* *C. jejuni* 1: 0,25µl, *C. jejuni* 2: 0,25µl, *C. lari* 1: 0,25µl, *C. lari* 2: 0,25µl, *C. coli* 1: 0,5µl, *C. coli* 2: 0,5µl, *C. fetus ssp. fetus* 1: 0,5µl, *C. fetus ssp. fetus* 2: 0,5µl, *C. upsaliensis* 1: 1,0µl, *C. upsaliensis* 2: 1,0µl, 23S rRNA 1: 0,2µl, 23S rRNA 2: 0,2µl

Primer	Sequenz forward (1)	Sequenz reverse (2)	PCR- Produkt
C.c. (1/2)	5'-GTAAAACCAAAGCTTATCGTG-3'	5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG-3'	126 bp
C.u. (1/2)	5'-AATTGAAACTCTTGCTATCC-3'	5'-TCATACATTTTACCCGAGCT-3'	204 bp
C.l. (1/2)	5'-TAGAGAGATAGCAAAAGAGA-3'	5'-TACACATAATAATCCCACCC-3'	251 bp
C.j. (1/2)	5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3'	5'-GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'	323 bp
C.f.f. (1/2)	5'-GCAAATATAAATGTAAGCGGAGAH-3'	5'-TGCAGCGGCCCCACCTAT-3'	435 bp
23S rRNA (1/2)	5'-TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG-3'	5'-ATCAATTAACCTTCGAGCACCG-3'	650 bp

Tab. 10: Verwendete Primer nach Wang et al. (2002)

Der Mastermix wurde kurz gemischt und in sterile 0,2 ml- Reaktionsgefäße mit jeweils 22,5 µl aliquotiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 2,5 µl DNA (Proben; Referenzstämme: *C. coli* DSMZ 4689, *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. fetus* ssp. *fetus* DSMZ 5361, *C. lari* DSMZ 11375, *C. upsaliensis* DSMZ 5365). Die Reaktionsgefäße wurden gut verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Anschließend wurde folgendes PCR- Programm gestartet.

Schritt 1: 4 min 94°C
Schritt 2: 45 sec 94°C
Schritt 3: 45 sec 55,5°C
Schritt 4: 45 sec 72°C
30 Zyklen: Schritt 2 – 4
Schritt 5: 4 min 72°C
Schritt 6: herunterkühlen auf 4°C

Die anschließende Gelelektrophorese fand in mit TAE- Puffer gefüllten Gelelektrophorese- Kammern statt. Die PCR- Amplifikate wurden mit je 10 µl Ladepuffer gemischt, und von dieser Mischung wurden 10 µl in die Geltaschen gefüllt. Pro Laufbahn wurden ebenfalls Marker, Positiv- und Negativ- Kontrollen mitgeführt. Nach Anschließen der Gelkammer an ein Spannungsgerät wurde die Gelelektrophorese (200 mA, 100 V, 42 min) gestartet. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in Ethidium- Bromid- Färbe- Lösung geschwenkt und für weitere 20 min in Aqua bidest. gewässert.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über ein System bestehend aus verschließbarer UV- Kammer, Rechner mit speziellem Programm und einem Gelfotodrucker. Bei der Auswertung galt eine Probe als positiv, wenn ein spezifisches Amplifikat nachgewiesen werden konnte, und die Negativ- Kontrolle negativ war. Die Probe galt als negativ, wenn trotz positiver Positiv- Kontrolle ein spezifisches Amplifikat nicht nachgewiesen werden konnte.

### **3.2.10 Genotypische Differenzierung ausgewählter Isolate mittels AFLP**

246 ausgewählte *Campylobacter*- Isolate wurden der molekularbiologischen Differenzierung mit Hilfe der AFLP- Analyse nach Duim et al. (1999) unterzogen. Dabei handelte es sich um 79 Poolproben- und 167 Einzelproben- Isolate von wiederkehrend *Campylobacter*- positiven Masthähnchenherden.

#### **3.2.10.1 DNA- Reinigung**

Die bei -80°C gelagerten *Campylobacter*- Isolate wurden auf Mueller- Hinton- Blut- Agar gebracht und bei 42°C für 48h mikroaerob bebrütet. Anschließend wurde die DNA unter zur Hilfenahme des DNeasy- Kits von Qiagen isoliert. Hierzu wurde Koloniematerial in 1,4 ml TE- Puffer verrieben, homogenisiert und bei 7500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 180 µl ATL- Puffer gelöst. Dann wurden 20 µl Proteinase K dazugegeben, homogenisiert und bei 55°C für 2h unter Rütteln auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 4 µl RNaseA hinzugegeben, gemixt und bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Danach wurden die Proben 15 sec lang homogenisiert und nach Zugabe von 200 µl AL- Puffer und erneutem Mixen für 10 min bei 70°C inkubiert. Sodann wurden zu jeder Probe 200 µl Ethanol (90-100%) gegeben und das Ganze homogenisiert. Die Mischung wurde nun in DNeasy- Säulen, die auf einem 2 ml Sammel- Tube saßen, pipettiert und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Wenn sich noch Flüssigkeit in der Säule befand, wurde für eine weitere Minute zentrifugiert. Die DNeasy- Säulen wurden dann auf neue 2 ml Sammel- Tubes gesetzt. Anschließend wurden 500 µl AW1- Puffer zugegeben, und die Proben für 1-2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die DNeasy- Säulen wurden erneut auf neue 2 ml Sammel- Tubes gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl AW2- Puffer wurden die Proben für 4 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach dem Setzen der DNeasy- Säulen auf neue 2 ml Tubes wurden 100 µl AE- Puffer zugegeben und die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurden nochmals 100 µl AE- Puffer zugegeben, die Proben 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

Die Reinheit und die Menge der gewonnenen DNA wurde im Spektralphotometer durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm zwischen 1,7 und 1,9 konnte man von gut gereinigter DNA ausgehen. In 200 µl Elutionspuffer waren ca. 10 bis 30 µg DNA enthalten, dies entsprach einer DNA- Konzentration von 50 bis 150 ng/µl.

Die auf diese Weise erhaltenen DNA- Lösungen wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

### 3.2.10.2 AFLP- Analyse

#### 3.2.10.2.1 Restriktion

Restriktionsmix für eine Probe

Aqua bidest.	add.
NE2 Puffer	0,8 µl
BSA (10 mg/ml)	0,5 µl
<i>Hind</i> III (100.000 U/ml)	0,4 µl
<i>Hha</i> I (20.000 U/ml)	1,0 µl
DNA	1-9 µl (entsprechen 100-150ng DNA)
<b>Summe</b>	<b>12 µl</b>

Nach Zusammenmischen der Komponenten wurde der Restriktionsmix für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend weitere 15 Minuten bei 70°C auf dem Thermorüttler inkubiert.

Enzym	Erkennungs- Sequenz
<i>Hha</i> I	5'- GCG C- 3' 3'- C GCG- 5'
<i>Hind</i> III	5'- A AGCTT- 3' 3'- TTCGA A- 5'

Tab. 11: Verwendete Restriktionsenzyme

#### 3.2.10.2.2 Ligation

Ligationsmix für eine Probe

Aqua bidest.	8,4 µl
Ligasepuffer	1,4 µl
Ligase (1:40)	1,0 µl
Adapttermix	2,0 µl
DTT	0,2 µl
Restriktionsmix	12 µl
<b>Summe</b>	<b>25 µl</b>

Nach Zusammenmischen der Komponenten wurde der Ligationsmix für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 175 µl Aqua bides t. aufgefüllt.

#### Adaptermix für eine Probe

HindadI (5 pmol/μl)	0,5 μl
HindadII (5 pmol/μl)	0,5 μl
HhaadI (50 pmol/μl)	0,5 μl
HhaadII (50 pmol/ml)	0,5 μl
<b>Summe</b>	<b>2,0 μl</b>

<b>Adapter</b>	<b>Erkennungs- Sequenz</b>
HhaadI	5'- GAC GAT GAG TCC TGA TCG- 3'
HhaadII	5'- ATC AGG ACT CAT CG- 3'
HindadI	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3'
HindadII	5'- AGC TGG TAC GCA GTC- 3'

Tab. 12: Verwendete Adapter

#### 3.2.10.2.3 Präselektive PCR

##### PCR- Mix für eine Probe

Mix (dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , Polymerase)	15 μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 μl
Hhapre	2,0 μl
Hindpre	0,6 μl
Template	4,0 μl

Nach Zusammenmischen der Komponenten wurden die Tubes verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Es wurde folgendes Cyclingschema verwendet:

Schritt 1:	2 min 72°C
Schritt 2:	20 sec 94°C
Schritt 3:	30 sec 56°C
Schritt 4:	120 sec 72°C
20 Zyklen:	Schritt 2 – 4
Schritt 5:	herunterkühlen auf 4°C

Die präselektive Lösung wurde mit Aqua bidest. auf 200 μl aufgefüllt.

### 3.2.10.2.4 Selektive PCR

PCR- Mix für eine Probe

Mix (dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , Polymerase)	15 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0 µl
Hhasel	2,0 µl
Hindsel	0,6 µl
Template	4,0 µl

Nach Zusammenmischen der Komponenten wurden die Tubes verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Es wurde folgendes Cyclingschema verwendet:

Schritt 1:	20 sec 94°C
Schritt 2:	30 sec 66°C
Schritt 3:	120 sec 72°C
10 Zyklen:	Schritt 1 – 3
Schritt 4:	20 sec 94°C
Schritt 5:	30 sec 56°C
Schritt 6:	120 sec 72°C
20 Zyklen:	Schritt 4 – 6
Schritt 7:	30 min 60°C
Schritt 8:	herunterkühlen auf 4°C

Primer	Erkennungs- Sequenz
Hhapre	5'- GAT GAG TCC TGA TCG C- 3'
Hhasel	5'- GAT GAG TCC TGA TCG CA- 3'
Hindpre	5'- GAC TGC GTA CCA GCT T- 3'
Hindsel	5'- GAC TGC GTA CCA GCT TA- 3'

Tab. 13: Verwendete Primer

### 3.2.10.2.5 Gelelektrophorese

Für die sich anschließende Gelelektrophorese wurde ein 12,5%iges Polyacrylamidgel auf die durch Wasserkühlung auf 15°C gekühlte Elektrophoreseplatte gelegt. Zuvor wurde die Platte mit Kerosin dünn bestrichen, um eine genügende Temperierung und Haftung des Gels zu gewährleisten. Danach wurden die beiden Laufpuffer an den Längsseiten des Gels (Anode und Kathode) luftblasenfrei aufgelegt. 5 µl PCR-Amplifikate wurden mit je 2 µl Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Pro Laufbahn wurden ebenfalls Längenmarker, Positiv- und Negativ- Kontrollen mitgeführt.

Nach Anschließen der Gelkammer an ein Spannungsgerät wurde die Gelelektrophorese (50 mA, 600 V, 30 W, 90 min) gestartet.

Nach Beenden der Elektrophorese wurden die PCR- Amplifikate durch Silberfärbung mit einem DNA Silver Staining Kit sichtbar gemacht.

Schritt	Lösung	Dauer
1	Fixierungs- Lösung	30 min
2	Silber- Lösung	30 min
3	Wasser	2 min
4	Entwicklungs- Lösung	3 min
5	Stopp- und Fixierungs- Lösung	30 min

Tab. 14: Ablauf der Silberfärbung

Das Gel wurde nach Silberfärbung getrocknet und auf Gel- Fix<sup>®</sup>- Folie gebracht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Weißlicht.

#### 3.2.10.2.6 Auswertung

Die Auswertung der Fragmentmuster erfolgte mit der Software von Bionumerics, Version 3.5.

Hierzu wurden die Gelspuren zuerst konvertiert und normalisiert. Die Ähnlichkeiten der festgestellten Bandenmuster wurden über den Pearson- Korrelations- Koeffizienten berechnet und durch phylogenetische Bäume nach der unweighted pair- group method using arithmetic averages (UPGMA) dargestellt. *Campylobacter*- Isolate, die eine Similarität von über 90% aufwiesen, wurden als Cluster bezeichnet.

### **3.2.11 Mästeraudit**

#### **3.2.11.1 Herdeninformation**

Im Zeitraum von Mai 2004 bis April 2005 wurden 75 Mastanlagen von zwei Geflügelschlachtfirmen in die Studie einbezogen. Es waren vier verschiedene Haltungsformen vertreten: 60 konventionelle Mastanlagen, 5 Mastanlagen mit Louisiana- Ställen, 7 Mastanlagen mit Freilandhaltung und 3 Mastanlagen mit biologischer Haltung. Jede Mastanlage wurde mit Hilfe eines Fragebogens beurteilt, um mögliche Ursachen des *Campylobacter*- Eintrags in die Masthähnchenherden zu erkennen. Dabei wurden Angaben zum Gelände, zum Gebäude, zur Stallhygiene, zur Haltung, zum Stallklima, zur Versorgung und verschiedene Herdenparameter erfragt.

Pro Mastanlage wurde je eine Herde im Halbjahr (Sommerhalbjahr: Mai bis Oktober, Winterhalbjahr: November bis April) auf *Campylobacter* spp. untersucht. Probennahme und Untersuchungsgang erfolgten wie in den Kapiteln 3.2.1 bis 3.2.6 beschrieben.

#### **3.2.11.2 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Nutzung der Software SPSS, Version 12.0.

Aufgrund der bekannten Saisonalität im Vorkommen von *Campylobacter* spp. wurden die Befunde je Halbjahr und Jahr betrachtet. Die Befunde negativ und positiv für das Jahr sind dabei folgendermaßen definiert: negativ meint, weder im Sommer- noch im Winterhalbjahr wurden *Campylobacter* spp. nachgewiesen; positiv bedeutet, dass im Sommerhalbjahr und/oder im Winterhalbjahr *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden. Bei Variablen mit vielen Merkmalsausprägungen wurden diese in zwei bis drei Kategorien zusammengefasst. Dies geschah bei den Variablen Stallanzahl, Herdengröße, Abstand zu anderen Tierhaltungen, Wechsel des Desinfektionsmittels, Personenzuständigkeit, Reinigung, Serviceperiode, Haltungsform, Überprüfung der Klimaparameter. Für die Variablen, die das Gelände und die Gebäude beschrieben, wurden Punkte vergeben und addiert. Jedes „Ja“ ergab einen Punkt, jedes „Nein“ null Punkte (Scorebildung). Die zusammengeführten Punkte erbrachte die Einordnung in Kategorien.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Variablen mit Hilfe des exakten Testes nach Fisher ausgewertet. Dabei erfolgte der Vergleich der *Campylobacter*- positiven Herden gegen die *Campylobacter*- negativen Herden in Bezug auf die verschiedenen Merkmalsausprägungen der Variablen. Für Faktoren, die mit einer *Campylobacter*- Infektion signifikant assoziiert waren, wurden Odds Ratios (OR) berechnet, um die

Wahrscheinlichkeit, dass der *Campylobacter*- Befund positiv ist, darzustellen. Wenn drei Kategorien in die Analyse einfließen, wurde eine Bezugskategorie gewählt. Bei der Odds Ratio- Berechnung wurde dann die Bezugskategorie jeweils gegen eine andere Kategorie ins Verhältnis gesetzt ohne die dritte Kategorie zu berücksichtigen. Bei der Variable "Alter" geschah die Auswertung unter Benutzung des U- Testes nach Mann und Whitney.