

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

**Vergleich des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems
mit dem kulturellen Standardverfahren
zum Nachweis von *Campylobacter* spp.**

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

vorgelegt von
Aranya Sira Andrea Manopas
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2011
Journal-Nr.: 3538

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Hans Zessin
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Frerk Feldhusen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Campylobacter, poultry meat, detection, identification, diagnostic techniques, microbial contamination, food contamination, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 27.01.2012

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: 978-3-86387-106-2

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 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

Inhalt

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | LITERATUR..... | 2 |
| 2.1 | Historischer Überblick | 2 |
| 2.2 | Taxonomische Einordnung | 5 |
| 2.3 | Charakteristika von <i>Campylobacter</i> spp..... | 7 |
| 2.3.1 | Morphologie | 7 |
| 2.3.1.1 | Zellmorphologie | 7 |
| 2.3.1.2 | Koloniemorphologie..... | 7 |
| 2.3.2 | Wachstumsanforderungen und Biochemie | 8 |
| 2.3.3 | Tenazität | 9 |
| 2.3.3.1 | Hitzebeständigkeit | 10 |
| 2.3.3.2 | Tiefgefrieren und Gefrieren | 11 |
| 2.3.3.3 | Kühlen..... | 11 |
| 2.3.3.4 | Einfluss von Säuren..... | 12 |
| 2.3.3.5 | Osmotischer Stress | 13 |
| 2.3.3.6 | Oxidativer Stress | 13 |
| 2.3.3.7 | Desinfektionsmittel..... | 13 |
| 2.3.3.8 | Antibiotika | 14 |
| 2.3.3.9 | Bestrahlung..... | 16 |
| 2.4 | Epidemiologie beim Tier | 16 |
| 2.4.1 | Vorkommen und Verbreitung..... | 16 |
| 2.4.2 | Klinik | 20 |
| 2.4.3 | Therapie und Prävention | 21 |
| 2.4.4 | Reservoirs | 22 |
| 2.5 | Epidemiologie beim Menschen | 22 |
| 2.5.1 | Vorkommen und Verbreitung..... | 22 |
| 2.5.2 | Klinik | 23 |
| 2.5.3 | Therapie..... | 25 |
| 2.6 | Nachweisverfahren für thermophile <i>Campylobacter</i>..... | 26 |
| 2.6.1 | Kulturelle Nachweisverfahren..... | 26 |
| 2.6.1.1 | Campy-Line-Agar..... | 28 |
| 2.6.1.2 | ISO 10272:1995..... | 29 |
| 2.6.1.3 | ISO 10272:2006..... | 34 |
| 2.6.2 | Molekularbiologischer Nachweis und Speziesdifferenzierung | 37 |
| 2.6.3 | Immunologische Nachweisverfahren..... | 38 |
| 2.6.4 | Schnelltests und alternative Nachweisverfahren..... | 39 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.6.4.1 | SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System..... | 39 |
| 2.6.4.2 | Sonstige Nachweisverfahren: Singlepath®, miniVIDAS® und andere..... | 40 |
| 2.6.5 | Differenzierung der <i>Campylobacter</i> spp. und Typisierung | 43 |
| 2.6.5.1 | Biochemische bzw. Biotypisierung | 43 |
| 2.6.5.2 | Molekularbiologische Typisierung | 45 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 47 |
| 3.1 | Versuchsplanung und Vorversuche | 47 |
| 3.2 | Material zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. entsprechend ISO 10272:1995 (E) | 47 |
| 3.2.1 | Flüssige Nährmedien..... | 47 |
| 3.2.2 | Feste Nährmedien | 48 |
| 3.2.3 | Reagenzien..... | 50 |
| 3.2.4 | Verbrauchsmaterialien..... | 50 |
| 3.2.5 | Geräte..... | 50 |
| 3.3 | Herstellung der Nährmedien | 51 |
| 3.4 | Material zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. durch das SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System | 52 |
| 3.4.1 | Flüssige Nährmedien..... | 52 |
| 3.4.2 | Trockene Nährsubstanzen | 52 |
| 3.4.3 | Reagenzien..... | 52 |
| 3.4.4 | Verbrauchsmaterialien..... | 52 |
| 3.4.5 | Geräte..... | 53 |
| 3.5 | Zusätzlich verwendetes Nährmedium zur Untersuchung dreier <i>E. coli</i>-Stämme | 53 |
| 3.6 | Referenzstämmen | 53 |
| 3.7 | Untersuchungsmaterial | 53 |
| 3.8 | Methoden..... | 54 |
| 3.8.1 | Probenaufbereitungsverfahren A..... | 54 |
| 3.8.2 | Probenaufbereitungsverfahren B..... | 55 |
| 3.8.3 | Positiv- und Negativkontrollen | 55 |
| 3.8.4 | Kultivierung von <i>Campylobacter</i> spp. aus dem Probenmaterial gemäß ISO 10272:1995 (E)-Methode im ISO-MPN-Verfahren..... | 56 |
| 3.8.4.1 | ISO-MPN-Verfahren | 56 |
| 3.8.4.2 | Anreicherung | 58 |
| 3.8.4.3 | Beimpfung von Nährböden und Identifizierung | 58 |
| 3.8.4.4 | Bestätigungsverfahren..... | 58 |
| 3.8.4.5 | Gram-Färbung | 59 |
| 3.8.4.6 | Hängender Tropfen..... | 59 |
| 3.8.4.7 | Wachstum bei 25 °C..... | 59 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.8.4.8 | Biochemische Tests..... | 59 |
| 3.8.5 | Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. durch das SimPlate™ Campylobacter CI-System.... | 61 |
| 3.8.6 | Inokulation von Platten des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems mit drei verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen..... | 66 |
| 3.8.7 | Bestätigung der durch ISO 10272:1995 (E)-Methode nachgewiesenen <i>Campylobacter</i> spp. durch PCR..... | 66 |
| 4 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... | 70 |
| 4.1 | Vorbemerkung | 70 |
| 4.2 | Vorversuche | 70 |
| 4.3 | Hauptversuche..... | 72 |
| 4.3.1 | Auswertung der Ergebnisse des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems im Vergleich mit denen der ISO 10272:1995 (E)-Methode im MPN-Verfahren („ISO-MPN“) | 72 |
| 4.3.2 | Auswertung der artifiziell kontaminierten Versuchsansätze und der Negativkontrollen.... | 78 |
| 4.3.3 | Untersuchung dreier <i>E. coli</i> -Stämme mit Hilfe des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems | 81 |
| 4.3.4 | Speziesdifferenzierung | 82 |
| 5 | SCHLUSSFOLGERUNGEN | 86 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 87 |
| 7 | SUMMARY | 89 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 91 |
| 9 | ANHANG | 107 |
| 10 | PUBLIKATIONSLISTE | 124 |
| 11 | DANKSAGUNG | 125 |
| 12 | SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG..... | 126 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab. 1: Wachstumsanforderungen und -grenzen für <i>C. jejuni</i> unter mikroaeroben Bedingungen (ICMSF, 1996) | 8 |
| Tab. 2: Charakteristika thermophiler <i>Campylobacter</i> spp. (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 1995) | 33 |
| Tab. 3: Eigenschaften zur Speziesdifferenzierung von bei 42,0 °C wachsenden <i>Campylobacter</i> spp. (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 1995) | 34 |
| Tab. 4: Eigenschaften von <i>Campylobacter</i> spp., die gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-107 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007) überprüft werden | 36 |
| Tab. 5: Differenzialdiagnostisch verwendete Eigenschaften von <i>Campylobacter</i> spp. gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-107 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007) | 37 |
| Tab. 6: Auflistung ausgewählter Detektionsverfahren zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. | 42 |
| Tab. 7: Diagnosemerkmale zur Differenzierung von humanpathogenen <i>Campylobacter</i> spp. nach CORRY et al. (2003)..... | 44 |
| Tab. 8: Auflistung ausgewählter molekularbiologischer Typisierungsverfahren zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp..... | 46 |
| Tab. 9: Auswertungstabelle für die MPN-Technik aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 01.00-2 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL), 1991) | 57 |
| Tab. 10: Auswertungstabelle für das SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System (SCHUSTER, 2002b)..... | 64 |
| Tab. 11: Vertrauensbereich des SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-Systems (SCHUSTER, 2003a) | 65 |
| Tab. 12: Verwendete Primer nach WANG et al. (2002) | 67 |
| Tab. 13: Zusammensetzung eines 25 µl-mPCR-Ansatzes und des dazugehörigen Primermixes für die Untersuchung einer Probe..... | 68 |
| Tab. 14: PCR-Programme | 68 |
| Tab. 15: Speziesidentifizierung mittels ISO 10272:1995 (E)-Methode und PCR: Vergleich..... | 84 |
| Tab. 16: Bei den Versuchen verwendete Geflügelfleischsorten..... | 107 |
| Tab. 17: Ergebnisse der Vorversuche | 107 |
| Tab. 18: Auswertung der positiven Ergebnisse aus der ISO 10272:1995 (E)-Methode im ISO-MPN-Verfahren | 108 |
| Tab. 19: Quantitativer und qualitativer Vergleich der Ergebnisse der ISO 10272:1995 (E)-Methode mit den Ergebnissen der PCR und des SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-Systems..... | 110 |
| Tab. 20: Ergebnisse der Untersuchung mit dem SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System..... | 113 |
| Tab. 21: Auswertung der Positivkontrollen unter Verwendung von <i>Campylobacter</i> spp.-Koloniematerial ohne die Verwendung von Geflügelfleisch mit einem <i>Campylobacter</i> -Gehalt unterhalb der Nachweiskontrolle | 117 |
| Tab. 22: Auswertung der artifiziell kontaminierten Proben unter Verwendung von <i>Campylobacter</i> spp.-Koloniematerial und Geflügelfleisch mit einem <i>Campylobacter</i> -Gehalt unterhalb der Nachweiskontrolle | 118 |
| Tab. 23: Ergebnisse der während der Versuchsreihen angelegten Negativkontrollen | 120 |

| | |
|--|-----|
| Tab. 24: Untersuchung dreier <i>E. coli</i> -Stämme mit Hilfe des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems zur Überprüfung auf eventuell falsch-positive Reaktionen..... | 121 |
| Tab. 25: Probennummer-Entsprechungen bei PCR und bei kultureller Untersuchung (Hauptversuche) | 123 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Flussdiagramm für das Untersuchungsprotokoll nach ISO 10272:1995 (E) der International Standards Organisation Methode zur Detektion von thermophilen <i>Campylobacter</i> in Lebensmitteln | 31 |
| Abb. 2: Flussdiagramm für das Untersuchungsprotokoll nach L00.00-107 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB gemäß der International Standards Organisation Methode zur Detektion von thermophilen <i>Campylobacter</i> in Lebensmitteln (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007) | 35 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung der Untersuchung nach ISO 10272:1995 im ISO-MPN-Verfahren | 61 |
| Abb. 4: SimPlate™-Platten nach der Bebrütung | 63 |
| Abb. 5: Schematischer Ablauf der Untersuchung unter Anwendung des SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-Systems | 63 |
| Abb. 6: Fließschema der Multiplex-PCR Untersuchung aus der Laboranweisung des BfR OE-Mikrobiologie – LA 138-1 nach WANG et al. (2002) | 69 |
| Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der positiven und negativen Ergebnisse der Vorversuche | 71 |
| Abb. 8: Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-Systems aufgrund der Ergebnisse der Hauptversuche unter Vernachlässigung der Fluoreszenz von roten Kavitäten | 73 |
| Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der positiven und negativen Ergebnisse der Hauptversuche unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-Systems | 75 |
| Abb. 10: Durch das ISO-MPN-Verfahren tatsächlich ermittelte <i>Campylobacter</i> spp.-Zahlen der Vor- und Hauptversuche zusammengefasst | 76 |
| Abb. 11: Einteilung der durch das ISO-MPN-Verfahren ermittelten <i>Campylobacter</i> spp.-Zahlen in Keimzahlbereiche, die sich zur besseren Vergleichbarkeit an den durch das SimPlate™-Verfahren erfassbaren Keimzahlbereichen orientieren | 76 |
| Abb. 12: Durch das SimPlate™-Verfahren tatsächlich ermittelte <i>Campylobacter</i> spp.-Zahlen..... | 77 |
| Abb. 13: Regressionsgerade für die Positivnachweise von <i>Campylobacter</i> spp. der Vor- und Hauptversuche durch das ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren..... | 77 |
| Abb. 14: Ergebnisse der mit dem ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Positivkontrollen ohne Verwendung von Geflügelfleisch | 80 |
| Abb. 15: Ergebnisse der mit dem ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Positivkontrollen unter der Verwendung von Geflügelfleisch | 80 |
| Abb. 16: Ergebnisse der mit dem ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Negativkontrollen..... | 81 |
| Abb. 17: Ergebnisse aus der Überprüfung dreier <i>E. coli</i> -Stämme auf die Ausbildung einer roten Farbreaktion im SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System | 82 |
| Abb. 18: PCR-Untersuchungsergebnisse von Koloniematerial der durch die ISO 10272:1995 positiv getesteten Proben | 85 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abb. | Abbildung |
|-----------------|--|
| AFLP | Amplifizierter Fragment-Längen-Polymorphismus |
| Aqua dest. | lat. aqua destillata, destilliertes Wasser |
| Aqua bidest. | lat. Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| a_w | Wasseraktivität |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| bp | Basenpaar |
| <i>C.</i> | <i>Campylobacter</i> |
| CCDA | Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar |
| cfu | colony forming unit, Kolonie bildende Einheit (KbE) |
| CI | Color Indicator |
| CLA | Campy-Line-Agar |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| d | Tag(e) |
| DIN | Deutsche Industrienorm |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| rDNA | ribosomal desoxyribonucleic acid, ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay, enzymgebundener Adsorptionstest |
| EN | Europäische Norm |
| et al. | lat. et alii, und andere |
| EU | Europäische Union |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| H ₂ O | Wasser |
| ISO | International Standardization Organisation |
| kDa | Kilodalton |
| kGy | Kilogray |
| KOH | Kalilauge |
| l | Liter |
| I-ALA | I-Alanin-Aminopeptidase |
| LFGB | Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch |
| LMBG | Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz |
| mCCDA | modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate-Agar |
| mg | Mikrogramm |
| MIC | Minimum Inhibitory Concentration, Minimale Hemmkonzentration (MHK) |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| MLST | Multilocus-Sequenz-Typisierung |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| MPN | Most Probable Number |
| n | Probenzahl |
| nm | Nanometer |
| NaCl | Natriumchlorid, Kochsalz |
| PCR | polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion |
| PFGE | Pulsfield-Gelelektrophorese |
| pH | Pondus Hydrogenii; negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| QAC | Quaternäre Ammoniumverbindung |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rRNA | ribosomal ribonucleic acid |
| rRNS | ribosomale Ribonukleinsäure |
| S. | <i>Salmonella</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| s | Sekunde(n) |
| SB- | Selbstbedienungs- |
| SOD | Superoxid-Dismutasen |
| sp./spp. | Spezies, Art (Singular/Plural) |
| ssp. | Subspezies |
| Tab. | Tabelle |
| ™ | unregistered trade mark |
| TTC | 2,3,5-Triphenyltetrazolium-Chlorid |
| U | Unit(s) |
| UPTC | Urease-positive thermophile Campylobacter |
| UV | ultraviolett |
| W | Watt |
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |

1 Einleitung

2004 bildete die Salmonellose noch die häufigste bakterielle Ursache humaner Durchfallerkrankungen. Im Folgejahr wurde sie durch die Campylobacteriose mit 195.426 in der EU gemeldeten Erkrankungen abgelöst. Während Infektionen mit Salmonellen sich stetig im Abwärtstrend befinden, bleiben solche durch thermophile *Campylobacter* auf einem nahezu konstanten Niveau. Bei der Campylobacteriose handelt es sich derzeit um die dritthäufigste der meldepflichtigen Erkrankungen nach Infektionen mit Noro- und Rotaviren (EFSA, 2009, ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010).

Die ISO-Normen enthalten zuverlässige Methoden zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp.. Wegen des erheblichen Zeitaufwandes der Referenzmethode ist es verständlich, dass zahlreiche Schnellverfahren entwickelt wurden, die sich hinsichtlich ihrer Selektivität und Spezifität an den Standardverfahren messen lassen müssen. In der durchgeführten Untersuchung wurde überprüft, inwieweit sich die Ergebnisse des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems der Firma BioControl mit denen des Referenzverfahrens der ISO 10272:1995 (E) decken.

Bei dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System handelt es sich um ein kulturelles Schnellverfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. innerhalb von 48 h. Eine Speziesdifferenzierung findet dabei nicht statt. Als „Golden Standard“ zum Nachweis von *Campylobacter* spp. gilt nach wie vor die Methode der International Organisation for Standardization (ISO). Diese wurde in der Version der ISO 10272:1995 (E) im ISO-MPN (= Most Probable Number)-Verfahren durchgeführt, um auch die ermittelten Keimzahlen vergleichen zu können. Als Probenmaterial wurde natürlich kontaminiertes gekühltes Geflügelfleisch aus dem Berliner Einzelhandel verwendet.

2 Literatur

2.1 Historischer Überblick

Fünf Jahre nach seiner Promotion zum Doktor der Medizin in München 1881 veröffentlichte Theodor ESCHERICH (1886) eine neue Methode zur Untersuchung von Säuglingsfäzes. Zugleich beschrieb er erstmalig ein spiralig-gekrümmtes und nicht anzüchtbares Bakterium, welches er sowohl in Darm und Stuhl von Kindern als auch im Kot von an Diarrhoe verstorbenen Katzenwelpen nachgewiesen hatte. Er bezeichnete es als *Vibrio felinus*.

Unabhängig davon entdeckten einige Jahre darauf MCFADYEAN und STOCKMAN 1906 im Rahmen einer Untersuchung von seuchenhaftem Verwerfen bei Mutterschafen ein bislang unbekanntes Bakterium. Es ließ sich gehäuft aus abortierten Feten isolieren und ähnelte im mikroskopischen Bild einem Vibrion (MCFADYEAN und STOCKMAN, 1913).

1913 teilten MCFADYEAN und STOCKMAN mit, dass dieser Vibrion-ähnliche Mikroorganismus auch in der Lochialflüssigkeit infektiöser Aborte von Rindern in den USA nachweisbar ist und Aborte bei experimentell infizierten tragenden Kühen auslösen kann. Fünf Jahre später gewann SMITH (1918) eine mikroaerophile „Spirille“ aus abortierten Kälbern. Er vermutete eine Identität mit dem von MCFADYEAN und STOCKMAN (1913) beschriebenen Vibrion. Dieser Keim wurde als *Vibrio fetus* (SMITH und TAYLOR, 1919) bezeichnet. Die gattungsmäßige Zuordnung basierte zunächst auf der Tatsache, dass in jungen Kulturen kommaförmige Ausprägungen häufiger als spirillenförmige auftraten. In den folgenden Jahren wurde aus weiteren Ländern, wie Schweden (OLSON, 1946), Australien (HINDIMARSH, 1943), Südafrika (CANAHAM, 1948) und Japan (KAWASHIMA et al., 1954), von ebenfalls durch Vibrionen induzierten Aborten berichtet. In allen Veröffentlichungen betraf das spontane Vorkommen von Aborten, bei denen Vibrionen als Ursache identifiziert wurden, ausschließlich domestizierte Rinder und Schafe. 1927 wurde erstmalig ein Agglutinationstest zur Detektion von Vibrionen durch SMITH und ORCUTT (1927) vorgestellt.

Zu Beginn der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts gewannen JONES, ORCUTT und LITTLE (1932) ein Vibrion aus den Dünndärmen von an Winterdysenterie leidenden Kälbern und Rindern. Sie hielten diesen Mikroorganismus für die Ursache der Erkrankung und nannten ihn *Vibrio jejuni*. Ein gleichartiger Mikroorganismus wurde von DOYLE (1944) aus dem Dickdarm von an Dysenterie erkrankten Schweinen isoliert und als *Vibrio coli* bezeichnet. Bis dahin nahm man an, dass eine natürliche Infektion durch diesen Mikroorganismus nur bei Haussäugetieren vorkommen würde, obwohl CURTIS (1913) bereits lange zuvor von einer Infektion zweier Patientinnen berichtet hatte, die beide aufgrund von uterinem Ausfluss während ihrer Schwangerschaft untersucht worden waren. Bei den zwei Frauen konnte ein gebogener, beweglicher, anaerober Mikroorganismus isoliert werden, den CURTIS jeweils dem Genus *Vibrio* zugeschrieben hatte. Ein weiteres Mal wurde dieses Vibrion von LEVY (1946) in Verbindung mit einer Erkrankung des Menschen bei akuten Durchfallerkrankungen nach dem Verzehr von Rohmilch gebracht, wobei der Autor biochemisch und morphologisch

Vibrio jejuni- bzw. *Vibrio fetus*-ähnliche Mikroorganismen in 20 Blutkulturen von Patienten nachweisen konnte. Zusätzlich wurden auch in 31 Stuhlproben der 73 untersuchten Personen Vibrionen ermittelt. Jedoch missglückte die Kultivierung der verdächtigen Keime auf einem festen Nährmedium, und so blieb ein eindeutig positiver Nachweis aus.

VINZENT et al. gelangen 1947 die Isolierung von *Vibrio fetus* aus dem Blut dreier schwangerer Frauen, die aufgrund von Fieber unbekannter Ursache untersucht worden waren. Die Erkrankung dauerte ungefähr vier Wochen an. Zwei der drei Patientinnen erlitten infolgedessen eine Fehlgeburt. An den Plazenten dieser Frauen zeigten sich große nekrotische und auch entzündliche Bereiche.

Kurz darauf berichtete WARD (1948) von der zufälligen Isolierung eines s-förmigen, gramnegativen Mikroorganismus. Ziel seiner Arbeit war es eigentlich, eine Staphylokokken-Reinkultur für die Stammsammlung seines Labors anzuzüchten. Dafür wurden aus einer aseptisch geöffneten Pustel auf der Wange eines Laborangestellten Eiter sowie Exsudat gewonnen und davon Verdünnungsausstriche auf mehreren mit 10 % Blut angereicherten Nähragarplatten erstellt. Nach Anzucht wurde ein Grampräparat angefertigt, welches allerdings neben großen grampositiven Mikroorganismen auch kleine, gewundene, gramnegative Stäbchen aufwies. Während die grampositiven Bakterien auf den Agarnährböden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C innerhalb von 24 h sichtbare Kolonien ausbildeten, wuchsen die gramnegativen Keime nur spärlich. Sie wurden auf ein frisches, mit Blut angereichertes Medium übertragen und unter einer mit 10 % CO₂ angereicherten Atmosphäre bebrütet. Das Wachstum konnte dadurch deutlich verbessert werden. Nach drei bis vier Tagen bildeten sich Kolonien mit einem Durchmesser von 1 bis 3 mm. Sie zeigten zudem eine glatte, glänzende, konkav erhabene Oberfläche sowie eine blaue bis blau-graue Farbe. Bei einem Agglutinationstest stellte sich heraus, dass es sich vermutlich um eine Sekundärinfektion durch *Vibrio fetus* handelte. Der betroffene Laborangestellte hatte einige Wochen zuvor bei wissenschaftlichen Untersuchungen mit diesem Erreger gearbeitet.

Vibrio fetus ssp. *venerealis* war als Ursache für Aborte bei landwirtschaftlichen Nutztieren wie Rindern und Schafen bereits hinlänglich bekannt, als SJOLLEMA et al. (1949) die Vermutung äußerten, dass dieser Keim auch der Erreger der in Holland seit langem bei Rindern auftretenden enzootischen Sterilität sein könnte. In seinem Bericht zum FAO-Kongress zur Unfruchtbarkeit bei Rindern 1954 stellte LAWSON (1954) eine These auf, wonach Infektionen durch *Vibrio fetus* nicht nur den wichtigsten, sondern auch den am weitesten verbreiteten Faktor für Fruchtbarkeitsstörungen in der englischen Rinderzucht bildeten.

1957 trug KING (1957) die bis dahin beschriebenen Fälle von humanen Infektionen mit *Vibrio fetus* und einem, wie sie es nannte, *Vibrio*-verwandten Mikroorganismus in einer Veröffentlichung zusammen und stellte diese einander gegenüber. Zum Vergleich zog sie verschiedene Isolate von Vibrionen (*Vibrio fetus*-Stämme humaner und tierischer Herkunft, *Vibrio bubulus*, *Vibrio jejuni* und *Vibrio*-verwandte Stämme) heran, führte serologische Untersuchungen durch und überprüfte unterschiedliche Möglichkeiten der Kultivierung. Sie stellte fest, dass der Mikroorganismus, der von JONES (1932) als *Vibrio jejuni* bezeichnet worden war, sich nicht in Morphologie und Wachstumscharakteristik von *Vibrio fetus* unterschied. Allerdings erbrachten ihre Untersuchungen, dass die *Vibrio fetus* und *Vibrio*

bubulus-ähnlichen Stämme bevorzugt bei Temperaturen zwischen 25 und 37 °C wuchsen, während drei der vier *Vibrio*-verwandten Stämme, die sie aus dem Blut an Enteritis erkrankter Kinder gewonnen hatte, kein Wachstum bei 25 °C, aber deutlich gesteigertes bei 42 °C zeigten. Die Autorin vermutete, dass der *Vibrio*-verwandte Mikroorganismus eine tragende Rolle bei Durchfallerkrankungen von Kindern spielt, ein entsprechender Beweis aber ein Verfahren zu dessen Kultivierung aus Fäzes voraussetzen würde. Bislang war es nur möglich gewesen, den Erreger bei einer vorliegenden Septikämie aus dem Blut des betreffenden Patienten zu isolieren. Insbesondere wegen dieser analysetechnischen Probleme wurden bis 1972 nur zwölf Fälle von Infektionen mit *Vibrio*-verwandten Mikroorganismen bekannt.

Das Genus *Campylobacter* wurde erstmalig von SÉBALD und VÉRON (1963) vorgeschlagen, um die Mikroorganismen der Gattung *Vibrio* von denjenigen Keimen abzugrenzen, die zwar eine ähnliche Morphologie aufweisen, deren DNS sich jedoch durch niedrigere Guanin- und Cytosingehalte unterscheidet und die auch andere Wachstumsanforderungen und StoffwechsellLeistungen besitzen, wie z. B. strikte mikroaerobe Atmosphäre und fehlende glykolytische Aktivität.

In Australien wurde *Campylobacter* erstmals erfolgreich aus Stuhlproben durch COOPER und SLEE (1971) isoliert. Sie stellten zunächst fest, dass *Campylobacter* sich resistent gegenüber Cephalothin verhält. Wurde nun eine Stuhlprobe unter Verwendung einer mit einer Cephalothinscheibe bestückten Blutplatte untersucht und bei mikroaeroben Bedingungen bebrütet, konnten sich die langsam wachsenden *Campylobacter* im Bereich der Hemmstoffzone vermehren, ohne von der fäkalen Begleitflora überwuchert zu werden. Im folgenden Jahr beschrieben DEKEYSER et al. (1972) eine Methode zur Isolierung von *Campylobacter* aus Stuhlproben mit Hilfe eines selektiven Filters. Dabei machten sie sich die geringe Größe von *Campylobacter* zunutze und trennten mit Hilfe eines Membranfilters der Porengröße 0,65 µm die meisten Fäkalkeime aus der Stuhlprobensuspension ab, was die Anzucht von *Campylobacter* auf einem festen Nährmedium gestattete. Auf diese Weise gelang es, die *Vibrio*-verwandten Mikroorganismen (*C. coli*/*C. jejuni*) aus dem Stuhl zweier an Diarrhoe erkrankter Erwachsener zu isolieren. Unter Anwendung dieser Methode untersuchten BUTZLER et al. (1973) Stuhlproben von mehreren hundert Patienten. Sie konnten auf diese Weise ein gehäuftes Vorkommen von *C. coli*/*C. jejuni* in den Fäzes von an Diarrhoe Erkrankten nachweisen. Die Publikation blieb zunächst jedoch von der Wissenschaft unbeachtet.

Eine von SKIRROW (1977) groß angelegte Untersuchung von Diarrhoepatienten und gesunden Personen ergab ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von *C. coli*/*C. jejuni* bei an Enteritis erkrankten Personen. Besonders häufig konnte eine Infektion bei Kindern nachgewiesen werden. Außerdem nannte er Nutzgeflügel als mögliche Infektionsquelle. Sowohl BUTZLER et al. (1973) als auch SKIRROW (1977) entwickelten selektive Kulturmedien zum Nachweis von *Campylobacter*. Beide Medien enthielten mehrere antimikrobielle Substanzen zur Unterdrückung der Begleitflora, was den sicheren Nachweis von *Campylobacter* als Ursache für humane Enteritiden ermöglichte. Damit war die Phase der Einordnung von *Campylobacter* spp. als human- und tierpathogener Keim abgeschlossen, obgleich bis heute an sicheren und effektiven Nachweismethoden für diesen Keim auf

unterschiedlicher Basis gearbeitet wird. In der weiteren Entwicklung wurden neue Spezies entdeckt und beschrieben. Auch die taxonomische Einordnung wurde mehrmals korrigiert. Diese Vorgänge sind noch nicht abgeschlossen. Neuere Spezies sowie die zurzeit geltende Taxonomie sind im folgenden Kapitel 2.2 dargestellt.

2.2 Taxonomische Einordnung

Aufgrund der Morphologie im mikroskopischen Bild wurden *Campylobacter*-Keime bei ihrer Entdeckung zu Anfang des 20. Jahrhunderts der Gattung *Vibrio* zugerechnet (ESCHERICH, 1886). Erst als DNS-Untersuchungen möglich geworden waren, wurde aufgrund ihres Guanin- und Cytosingehaltes eine neue Klassifizierung als Gattung *Campylobacter* (griechisch: κάμπυλος, *kampylos*: gekrümmt/gebogen; *bakterion*: Stab) durch SEBALD und VÉRON (1963) vorgeschlagen. Zu jener Zeit umfasste dieses Genus lediglich die Spezies *C. fetus* und *C. bubulus*. 1973 veröffentlichten VÉRON und CHATELAIN die erste anerkannte Taxonomie des Genus *Campylobacter*, in der vier Spezies aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften voneinander abgegrenzt wurden.

Zwischenzeitlich erfolgte durch SMIBERT (1974) eine taxonomische Einordnung in die Familie der *Spirillaceae*. Andererseits fasste KRIEG (SMIBERT, 1984) das Genus *Campylobacter* mit weiteren morphologisch und/oder physiologisch ähnlichen Gattungen zur „Sektion aerober/mikroaerophiler, beweglicher, helikaler/vibrioider, gram-negativer Bakterien“ zusammen.

Die heute bekannten *Campylobacter* spp. gehören dem Reich der Eubacteria, der Abteilung (Phylum) der Proteobacteria, der Klasse der Epsilonproteobacteria und hier der Ordnung der *Campylobacterales* an. Diese Ordnung unterteilt sich in drei Familien, die *Campylobacteraceae*, die *Helicobacteraceae* und die *Hydrogenimonaceae*. Zu der Familie der *Campylobacteraceae* zählen u. a. die Gattungen *Arcobacter* und *Campylobacter* und zu der Familie der *Helicobacteraceae* u. a. die Gattung *Helicobacter*.

Der Gattung *Campylobacter* werden nunmehr 25 Spezies zugeordnet (EUZÉBY, 2011):

1. *Campylobacter avium*
2. *Campylobacter canadensis*
3. *Campylobacter coli*
4. *Campylobacter concisus*
5. *Campylobacter cuniculorum*
6. *Campylobacter curvus*
7. *Campylobacter fetus*
8. *Campylobacter gracilis*
9. *Campylobacter helveticus*
10. *Campylobacter hominis*
11. *Campylobacter hyoilei*
12. *Campylobacter hyointestinalis*
13. *Campylobacter insulaenigrae*
14. *Campylobacter jejuni*
15. *Campylobacter lanienae*
16. *Campylobacter lari*
17. *Campylobacter mucosalis*
18. *Campylobacter peloridis*
19. *Campylobacter rectus*
20. *Campylobacter showae*
21. *Campylobacter sputorum*
22. *Campylobacter subantarcticus*
23. *Campylobacter upsaliensis*
24. *Campylobacter ureolyticus*
25. *Campylobacter volcuris*

Außerdem existieren folgende Subspezies (EUZÉBY, 2011):

- *Campylobacter fetus* ssp. *fetus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*
- *Campylobacter hyointestinalis* ssp. *hyointestinalis*, *Campylobacter hyointestinalis* ssp. *lawsonii*
- *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei*, *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*
- *Campylobacter lari* ssp. *concheus*, *Campylobacter lari* ssp. *lari*
- *Campylobacter sputorum* ssp. *bubulus*, *Campylobacter sputorum* ssp. *sputorum*.

2.3 Charakteristika von *Campylobacter* spp.

2.3.1 Morphologie

2.3.1.1 Zellmorphologie

Morphologisch stellen sich *Campylobacter* spp. als gebogene, teilweise spiralförmig gewundene, bewegliche Stäbchen dar. Sie bilden keine Sporen aus und verhalten sich gramnegativ. Es handelt sich im Vergleich zu anderen Bakterien um einen relativ kleinen Mikroorganismus von 0,2 bis 0,8 µm Durchmesser und einer Länge von 0,5 bis 5,0 µm (KARMALI et al., 1981; SMIBERT, 1978). Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, sind etwas kürzer (1,5 µm) und s-förmig bis gewunden, während solche in der stationären Phase länger sind. *C. coli* und *C. jejuni* besitzen meist nicht mehr als vier Windungen (KIST, 1991). Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Zellmorphologie innerhalb einer Kolonie stark variiert. So zeigen junge Zellen am Rande einer Kolonie eine spiralenartig gewundene Form, während sie sich im Zentrum kokkoid darstellen. Ringförmige Zellen wurden in der oberflächlichen Schicht der Peripherie nachgewiesen. Dieser Typ wird als Übergangsform im Alterungsprozess des Mikroorganismus vom spiraligen zum kokkoiden Erscheinungsbild gedeutet. Somit zeigen gealterte oder auch geschädigte *Campylobacter* zunehmend kokkoide Gestalt (NG et al., 1985a).

Campylobacter spp. zeigen durch ihre mono- bzw. bipolare monotriche Begeißelung (NG et al., 1985a) eine charakteristische kormenzieherartige Fortbewegung (VANDAMME und DELEY, 1991). Einige Spezies sind nicht beweglich, wie *C. gracilis*, oder besitzen mehrere Geißeln, wie *C. showae* (DEBRUYNE et al., 2008).

2.3.1.2 Koloniemorphologie

Die Koloniemorphologie der *Campylobacter* spp. wird durch das verwendete Kulturmedium beeinflusst und kann dementsprechend variieren. Im Allgemeinen bilden *Campylobacter* auf relativ trockenen Nährböden graue, erhabene, runde und glänzende Kolonien. Auf feuchten Nährböden – dabei handelt es sich meist um sehr frische, noch nicht abgetrocknete Medien – zeigen die Kolonien eine zunehmend flache, unregelmäßige Form und ebenfalls eine grau-

glänzende Farbe. Auf bluthaltigen Nährböden ist keine Hämolyse nachweisbar (VANDAMME, 2000).

2.3.2 Wachstumsanforderungen und Biochemie

C. jejuni und *C. coli* sind hinsichtlich ihres Nährstoffbedarfs wenig anspruchsvoll. Deshalb vermehren sie sich in einer Reihe von auf Pepton basierenden Medien. Allerdings können die meisten Stämme mindestens eine Aminosäure nicht selbst synthetisieren. Das Wachstum erfolgt strikt mikroaerob und optimal unter einem Gasgemisch, das 5–6 % Sauerstoff und 10 % CO₂ enthält. Einige Substanzen, wie Natriumpyruvat, Eisensulfat, Kohle oder Enzyme (z. B. Superoxid-Dismutase und Katalase), die Nährmedien zugesetzt werden, sind in der Lage, die Sauerstofftoleranz von *C. jejuni* und *C. coli* zu verbessern. Sie machen für den Organismus toxische Derivate des Sauerstoffs unschädlich (HOFFMAN et al., 1979; BOLTON UND COATES, 1983). Es besteht beispielsweise eine große Empfindlichkeit gegenüber Peroxid- und Superoxidanionen, die sich im Nährmedium bei Lichteinfall bilden können. Bei einem Kohlendioxidgehalt von 4–10 % wird das Wachstum einiger Stämme durch Zugabe unterschiedlicher Supplemente soweit unterstützt, dass eine Vermehrung bei Sauerstoffgehalten von bis zu 17 % ermöglicht wird (BOLTON UND COATES, 1983; JUVEN UND ROSENTHAL, 1985).

Campylobacter spp. sind neben der Anfälligkeit für oxidativen Stress relativ empfindlich gegenüber anderen äußeren Einflüssen wie Temperatur, Trockenheit, pH-Wert und Salzgehalt. Die geringe Tenazität läßt sich auf das Fehlen von entsprechenden Regulatoren zurückführen (PARKHILL et al., 2000). In Tab. 1 sind die Wachstumsanforderungen und -grenzen für *C. jejuni* dargestellt.

Tab. 1: Wachstumsanforderungen und -grenzen für *C. jejuni* unter mikroaeroben Bedingungen (ICMSF, 1996)

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

Kohlenhydrate werden von *Campylobacter* weder oxidiert noch fermentiert, auch sind Blutanteile im Nährmedium zum Wachstum nicht zwingend erforderlich. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die Gene Cj1613c und ChuABCD maßgeblich an der Verstoffwechslung von Häm/Hämoglobin beteiligt sind. Sofern Hemin die einzige Eisenquelle darstellt, führt eine Mutation dieser Gene dazu, dass kein Wachstum mehr

möglich ist (RIDLEY et al., 2006). Gelatine kann nicht hydrolysiert und so als Energiequelle genutzt werden. Thermophile *Campylobacter* reduzieren Selenit, zeigen Katalase- sowie Oxidaseaktivität und sind Indol-negativ. Allerdings besitzt *C. upsaliensis* nur geringe oder gar keine Katalaseaktivität. Die Arten unterscheiden sich voneinander in ihrer Sensitivität gegenüber Nalidixinsäure und der Fähigkeit zur Hydrolyse von Hippursäure, was eine Möglichkeit zu ihrer Differenzierung bietet (LAN und KOPENCKO, 2003).

Sowohl *Campylobacter* spp. als auch *Arcobacter* spp. und andere gramnegative Mikroorganismen liefern ein positives Ergebnis beim Kalilauge-Test (KOH-Test). Dabei werden 5 µl einer 0,5 molaren KOH-Lösung auf einen Objektträger verbracht und mit Hilfe einer Impföse etwas Koloniematerial darin suspendiert. Wird die Suspension viskös und bildet sogenannte „DNA-Strings“ aus, ist das Ergebnis positiv und charakteristisch für gramnegative Mikroorganismen.

Das Enzym l-Alanin-Aminopeptidase (l-ALA), welches generell in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommt und mehrmals als Differenzierungskriterium für gramnegative und grampositive Mikroorganismen vorgeschlagen wurde, kann indessen bei *Arcobacter* spp. und *Campylobacter* spp., obwohl beide gramnegativ, nicht nachgewiesen werden (HOOSAIN und LASTOVICA, 2009).

2.3.3 Tenazität

Die Tenazität (lateinisch: *tenacitas*, Hartnäckigkeit eines Bakteriums) beschreibt in der Mikrobiologie die Fähigkeit eines Keimes, unter suboptimalen Bedingungen zu überleben. *Campylobacter* spp. sind relativ empfindlich gegenüber ungünstigen äußeren Einflüssen wie Hitze, Säure, Desinfektionsmitteln und Gamma-Strahlung (JACOBS-REITSMA et al., 2000). So ist es dem Organismus in der Regel nicht möglich, außerhalb seines Wirtes längere Zeit in der Außenwelt zu bestehen. Das Überleben hängt dabei insbesondere von der Matrix ab, in der sich der Mikroorganismus befindet (BASERISALEHI et al., 2006). *C. jejuni* zeigt höhere Überlebensraten in Eigelb, Flüssig-Ei und verschiedenen Fleischsorten als in Milch oder Wasser. Die Absterberate fällt in steriler Milch geringer aus als in Rohmilch, wahrscheinlich aufgrund der bakteriziden Lactoperoxidase in Rohmilch. Sauerstoffmangel in der Tiefe von ansonsten zum Überleben günstiger Matrix kann ursächlich für eine erhöhte Absterberate sein (ICMSF, 1996). Trotz der geringen Säuretoleranz konnte bereits ein lebensfähiger *C. jejuni*-Stamm sowohl aus Domiati-Frischkäse (durch Enzyme fermentierter Rohmilchkäse mit einem Salzgehalt von 5–6 %) als auch aus Yoghurt (hier: pH 4,2–4,5) isoliert werden. Die Überlebenszeit betrug in diesen Produkten 7–14 Tage bzw. 2–3 Tage. Offenbar reagieren einige Stämme von *C. jejuni* weniger empfindlich auf bestimmte Methoden zur Haltbarmachung als gemeinhin bei diesem stressempfindlichen Keim bisher angenommen wurde (EI-SHAROUD, 2009). Das Überleben von *Campylobacter* spp. bei einem Kochsalzgehalt von 6,5 % und Temperaturen von 4 °C stellten ABRAM und POTTER (1984) bereits Jahre zuvor fest.

In artifiziell kontaminierten gereiften Rohwürsten aus Putenfleisch ließ sich *C. jejuni* nach ausreichender Reifung, die mit einer Absenkung des pH-Wertes einhergeht, und Abtrocknung

mit entsprechender a_w -Wert-Senkung nur nachweisen, wenn das verwendete Inokulum sehr hoch gewesen ist. Bei einer niedrigen Ausgangskontamination darf von einer vollständigen Inaktivierung von *C. jejuni* ausgegangen werden. Somit wäre eine absolute *Campylobacter*-Freiheit des Ausgangsmaterials bei solchen Produkten zum Schutze des Verbrauchers bei sorgfältiger Herstellung und Überprüfung des Reifungsprozesses nicht zwingend angezeigt (ALTER et al, 2006).

Obwohl *C. jejuni* keine der bei anderen Mikroorganismen bekannten Reaktionsmechanismen zur Anpassung an äußere Stressoren besitzt, zeigt der Keim doch ein unerwartet hohes Überlebenspotential in Lebensmitteln (PARK, 2002).

Campylobacter-Arten bilden allerdings zum Überdauern von ungünstigen Lebensbedingungen kokkoide, lebensfähige, jedoch nicht kultivierbare Zellen aus. Diese werden im Allgemeinen als VBNC (viable but non-culturable)-Zellformen bezeichnet. Die Stoffwechselaktivität ist in diesem Zustand gesenkt. Jedoch wird in der Regel die Fähigkeit zur Darmbesiedlung warmblütiger Tiere und auch die Infektiosität durch orale Aufnahme mit anschließender Darmpassage wiedererlangt (MURPHY et al., 2006).

2.3.3.1 Hitzebeständigkeit

Temperaturen über 55 °C führen schnell zum Zelltod von *C. jejuni*. Allerdings zeigten im Gegensatz zu *E. coli* K-12 die beiden *C. jejuni* Stämme NCTC 11168 und 2097e48 nach einer kurzen Phase der Kühlung, wie sie bei der Verarbeitung von Hähnchenfleisch vorkommt, keine erhöhte Sensitivität gegenüber einer Hitzeeinwirkung von 56 °C (HUGHES et al., 2009). Es wird angenommen, dass die Unfähigkeit von *Campylobacter* spp., ihre Fettsäurestruktur im Verlauf einer kurzen Kälteeinwirkung anzupassen, die Ursache dafür bildet, dass die hitzeunempfindlichere ursprüngliche Fettsäuresequenz erhalten und somit die Hitzetoleranz unverändert bleibt. Dagegen verschiebt sich bei *E. coli* das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren nach Kälteeinwirkung, um sich den äußeren Bedingungen anzupassen. Diese Reaktion von *C. jejuni* auf Kälteeinwirkung gilt als ungewöhnlich im Vergleich zu anderen durch Lebensmittel übertragenen Pathogenen (HUGHES et al., 2009).

Andererseits gelang MURPHY (2003) der Nachweis, dass *C. jejuni* CI 120 in der Lage ist, während der Wachstumsphase ein hitzestabiles Protein zu akkumulieren, welches wahrscheinlich eine aktive Rolle bei der Anpassung an äußere Stressoren, hier Hitze- und Säureeinfluss, spielt. Diese Fähigkeit könnte auch eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen von MOORE und MADDEN (2000) sein. Sie stellten aufgrund der Absterbekurve von *Campylobacter* spp. bei Temperaturen über 56 °C fest, dass eine thermostabile Subpopulation innerhalb des eingesetzten Stammes existieren dürfte, welche aufgrund der Akkumulation dieses hitzestabilen Proteins höhere Überlebensraten aufweist.

Eine Mikrowellen-Behandlung von Hähnchenoberschenkeln, die mit den thermotoleranten *Campylobacter*-Stämmen *C. jejuni* ATCC 33 291, *C. jejuni* PZH 38 und *C. coli* ATCC 43 478 beimpft wurden, für 2, 4, 6, 8 und 10 min bei 480 W bzw. 760 W führte zu einer vollständigen

Inaktivierung der Mikroorganismen bei 480 W innerhalb von 8–10 min und bei 760 W innerhalb von 6–8 min (URADZINISKI und NYESVYETOWA, 2009).

2.3.3.2 Tiefgefrieren und Gefrieren

Beim Tiefgefrieren von *C. jejuni* bei -15 bis -70 °C zeigt sich während des Tiefgefrierprozesses innerhalb der ersten 24 h eine häufig um das 10- bis in seltenen Fällen das 100.000-fache erhöhte Sterberate, gefolgt von einer deutlich verringerten Reduktion während der Lagerung (ICMSF, 1996). Dieses verlangsamte Absterben spiegelte sich auch bei einem Keimzahlvergleich nach drei und fünf Wochen von bei -20 °C tiefgefrorenen Hähnchenkarkassen wider. Die Ergebnisse unterschieden sich voneinander nur marginal (SANDBERG et al., 2005). Untersuchungen von GEORGSSON (2006) erbrachten ähnliche Resultate. So wurde eine Verminderung der *Campylobacter*-Zahl im Spülwasser natürlich kontaminierter Karkassen um eine Zehnerpotenz direkt nach dem Tiefgefrieren ermittelt. Ein anfangs vermuteter Einfluß der Auftautemperatur auf die Absterberate wurde wieder verworfen (MOORHEAD und DYKES, 2002). STEAD und PARK (2000) vermuteten, dass für den erhöhten Zelltod beim Tiefgefrieren mit anschließendem Auftauprozess nicht die mechanische Zerstörung von Zellen durch Eiskristalle oder eine Dehydratation ursächlich sind, sondern dass die Absterbevorgänge im daraus resultierenden oxidativen Stress begründet liegen.

Um die *Campylobacter*-Belastung von rohem Geflügelfleisch zu senken, wird angeregt, ein generelles Tiefgefrieren von frischem Hähnchenfleisch als weitere Hürde einzuführen, um den Kontaminationsgrad und somit die Gefahr von Campylobacteriosen in der Bevölkerung zu mindern. Trotz der initial hohen Sterberate beim Gefrieren zeigen die den Prozess überlebenden *Campylobacter* spp. keine subletalen Schädigungen (MOORHEAD und DYKES, 2002).

Angesichts des Mangels an Kälteschockgenen, wie *cspA*, überlebt *C. jejuni* bemerkenswert lange bei Gefriertemperaturen (SVENSSON et al., 2008). Eine Untersuchung von Geflügelfleischproben aus bulgarischen Supermärkten ergab eine Belastung von gefrorenen Hähnchenkarkassen mit *Campylobacter* von 35,2 %, während gekühlte Hähnchenteile je nach Teilstück von 48,9 bis 91,1 % mit *Campylobacter* spp. kontaminiert waren. In thermisch behandelte Ware aus Geflügelfleisch konnten keine *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden (STOYANCHEV et al., 2007).

2.3.3.3 Kühlen

Obwohl es thermophilen *Campylobacter* spp. nicht möglich ist, sich bei Temperaturen unter 30 °C zu vermehren (JACOBS-REITSMA et al., 2000), lassen sich dennoch Stoffwechselaktivitäten bei Kühlschranktemperaturen messen (KELLY et al., 2003). HAZELEGER et al. (1998) berichteten, dass bei Temperaturen unter 31-32 °C die beiden *C. jejuni* Stämme 104 und ATCC 33560 abrupt die Vermehrung einstellten, obwohl sich Stoffwechselaktivitäten wie Sauerstoffverbrauch, Katalaseaktivität, ATP-Bildung und Proteinsynthese noch bis zu einer Temperatursenkung auf 4 °C erfassen ließen. Derselbe Effekt war auch beim Überschreiten der maximalen Wachstumstemperatur um nur wenige Grad nachweisbar. Die Autoren

fürten den Befund darauf zurück, dass sich eine Strukturumwandlung eines oder mehrerer für das Wachstum entscheidender Schlüsselenzyme und/oder regulierender Komponenten stark temperaturabhängig verhält und somit limitierend wirkt.

Campylobacter jejuni wird in Lebensmitteln bei Kühltemperatur weniger als bei Raum- oder Gefriertemperatur inaktiviert (ICMSF, 1996).

Die Temperatur beeinflusst auch die Fähigkeit von *C. jejuni*, sich an Edelstahloberflächen anzuheften. Dieses Material findet gerade in Bereichen der Lebensmittelverarbeitung häufig Verwendung. Mit steigenden Temperaturen zwischen 4 und 55 °C nimmt das Vermögen von *C. jejuni* zu, sich auf solchen Oberflächen zu halten. Gleichzeitig nimmt die Fähigkeit ab, sich von diesen zu lösen. Auch die Einwirkzeit besitzt hierbei Bedeutung. So bringt eine höhere Einwirkungsdauer eine zunehmend schwere Lösbarkeit von der Oberfläche mit sich. Für die Praxis bedeutet dieser Befund, dass es durchaus sinnvoll ist, kontaminierte Oberflächen möglichst zeitnah zu reinigen und die Räumlichkeiten möglichst kühl zu halten (NGUYEN et al., 2010). Eine solche Empfehlung ist nicht spezifisch für die Spezies *Campylobacter*, sondern gilt auch für andere Mikroorganismen (HERALD und ZOTTOLA, 1988).

2.3.3.4 Einfluss von Säuren

Das Wachstum von *Campylobacter* spp. kann *in vitro* durch die Zugabe einer Mischung aus organischen Säuren wie Fumar-, Äpfel-, Bernstein- und Milchsäure zum Kultivierungsmedium in einer Menge von jeweils 10–40 mM verbessert werden (HINTON, 2006). 0,05 %-ige Ascorbinsäure hemmt dagegen die Vermehrung von *Campylobacter*, während 0,09 %-ige Lösungen bereits bakterizid wirken. Beim Schlachtprozess erzielte die Anwendung von Sprays und Tauchbädern mit Milch- und Essigsäure eine Reduzierung der *Campylobacter*-Zahlen (JACOBS-REITSMA et al., 2000). Dabei reagierten Zellen, die sich in der stationären Phase befanden, empfindlicher gegenüber Säureeinwirkung als solche in der Wachstumsphase, was eher unüblich für lebensmittelassoziierte Mikroorganismen ist. Dieses Phänomen läßt sich wahrscheinlich auf das unter 2.3.3.1 genannte, von MURPHY et al. (2003) entdeckte Protein zurückzuführen, welches in der Wachstumsphase gebildet wird.

Auch die gezielte Fütterung von Schlachtgeflügel mit Caprylsäure in einer Konzentration von 0,35 % und 0,7 % über sieben Tage bis zur Schlachtung senkte die Kolonisationsrate des Blinddarmes von Tieren mit *Campylobacter* deutlich. Ein ähnliches Ergebnis konnte durch die Zufütterung von 0,7 % Caprylsäure über nur drei Tage vor der Schlachtung, kombiniert mit einer vorherigen zwölfstündigen Fastenzeit, erzielt werden. Wahrscheinlich sind diese Effekte nicht auf die Senkung des pH-Wertes zurückzuführen. Vielmehr ist zu vermuten, dass eine prä- bzw. probiotische Wirkung und so eine Veränderung der Mikroflora des Darmes eintritt, wodurch *Campylobacter* zurückgedrängt wird. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer direkten inhibitorischen Wirkung auf die Ausbildung von Virulenzfaktoren (DE LOS SANTOS et al., 2009).

Das zum Wachstum von *Campylobacter* spp. erforderliche pH-Optimum ist der Tab. 1 zu entnehmen (ICMSF, 1996).

2.3.3.5 Osmotischer Stress

Viele Bakterien besitzen regulative Mechanismen, um osmotischem Stress bis zu einem gewissen Grad zu widerstehen. Dieses Regulativ scheint bei *Campylobacter* spp. kaum oder auch gar nicht vorhanden zu sein (PARKHILL et al., 2000).

Es gibt mehrere Berichte darüber, dass sich *C. jejuni* empfindlicher gegenüber hyperosmotischen Zuständen verhält als andere Pathogene, die durch Lebensmittel übertragen werden. Normalerweise findet ab einer Kochsalzkonzentration von 2 % kein Wachstum von *C. jejuni* mehr statt. Bislang wurde die Expression dreier Gene (*htrB*, *ppk1* und *cj1226c*) nachgewiesen, die zur Resistenz gegenüber hyperosmotischem Stress beitragen (SVENSSON et al., 2008).

Campylobacter spp. sind sehr anfällig gegenüber Austrocknung. Liegt der a_w -Wert der Umgebung unterhalb des Wertes 0,97, ist ein schnelles Absterben zu beobachten (OOSTEROM et al., 1983).

2.3.3.6 Oxidativer Stress

C. jejuni als mikroaerophiler und capnophiler Mikroorganismus zeigt optimales Wachstum bei einer Atmosphäre von 12 % CO₂ und 6 % O₂. Allerdings findet man *Campylobacter* spp. auch unter rein aeroben oder rein anaeroben Bedingungen. Daher liegt es nahe, dass *Campylobacter* spp. Mechanismen entwickelt haben müssen, um beispielsweise oxidativem Stress zu widerstehen. Im Gegensatz zu *E. coli*, der mehrere Superoxid-Dismutasen (SOD) ausbildet, die den Abbau von Hyperoxid zu H₂O katalysieren, und auch mehrere Katalasen, die wiederum den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser katalysieren, konnte bei *C. jejuni* bislang nur ein SOD kodierendes Gen, das *sodB*, identifiziert werden. Bei *C. jejuni* und *C. coli* ließ sich auch nur ein Gen zur Katalasekodierung, das *katA*, nachweisen. Außer diesen sind noch beispielsweise die Gene *ahpC*, *PerR* und *dps* ermittelt worden, die es *C. jejuni* gestatten sollen, sich bis zu einem gewissen Grad oxidativem Stress anzupassen (SVENSSON et al., 2008).

REUTER et al. (2010) zeigten, dass *C. jejuni* als Anpassung an die suboptimalen Bedingungen ausserhalb des Wirtes, vornehmlich wegen des hohen Sauerstoffgehaltes, einen Biofilm ausbildet. Dieser entsteht bei ungünstig hohen Sauerstoffgehalten und einer Begeißelung des Mikroorganismus schneller als unter optimalen mikroaeroben Verhältnissen. Folglich kann das Entstehen des Biofilms als direkte Stressantwort und -bewältigung angesehen werden. In ihm geschützt, ist es dem Mikroorganismus möglich, ungünstige Bedingungen zu überdauern. Somit läßt sich der Biofilm als ein Reservoir lebensfähiger Zellen interpretieren.

2.3.3.7 Desinfektionsmittel

Kokkoide, lebensfähige, jedoch nicht kultivierbare Zellformen von *C. jejuni* NCTC 11351 erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen (QAC), glutaraldehydhaltigen QAC und amphoterischen Tensiden, waren jedoch relativ resistent gegen chlorhaltige Desinfektionsmittel (ROWE et al., 1998). Gegenüber sieben

kommerziell erhältlichen Desinfektionsmitteln, die in einem türkischen Geflügelschlachtbetrieb angewendet wurden, zeigten sich *Staphylococcus* spp. und *Escherichia coli* als besonders empfindlich, wohingegen *Campylobacter* spp. und Salmonellen sich im Vergleich widerstandsfähiger verhielten. Dabei besaß das Produkt mit quaternären Ammoniumverbindungen als Wirkstoff insgesamt die höchste Effizienz. Bei Einwirkzeiten von 15 bis 30 min war es letztendlich möglich, alle überprüften Keime mit jeder der sieben Desinfektionslösungen wirkungsvoll abzutöten (SENER und TEMIZ, 2007).

WANG et al. (1983) überprüften verschiedene standardmäßig angewandte Desinfektionsmittel in gebräuchlichen Dosierungen und stellten fest, dass diese unter den Testbedingungen (pH 7,0, 24–26 °C) ausreichten, um *C. jejuni* effektiv abzutöten. So wurde ein Inokulum von 10^3 – 10^4 KbE/ml der drei überprüften *C. jejuni*-Stämme durch eine Lösung mit 1,25 mg Hypochlorid pro Liter und einer Einwirkzeit von 1 min inaktiviert; ebenso ein Inokulum von 10^7 KbE/ml durch eine Lösung mit 5,0 mg Hypochlorid auf 1 Liter innerhalb von 15 min. Die zum Abtöten erforderlichen Konzentrationen von Hypochlorid für *C. jejuni* und *E. coli* erwiesen sich bei diesem Versuch als gleich. Alle drei Stämme wurden bei einem Inokulum von 10^7 KbE/ml innerhalb von 1 min durch 0,15 %-ige phenolhaltige Desinfektionslösung, 10 mg Polyvinylpyrrolidon pro Liter, 1:50.000 verdünnte quaternäre Ammoniumverbindungen, 70 %-igen Ethylalkohol und 0,125 %-iges 1,5-Pentandial (Glutaraldehyd) abgetötet.

2.3.3.8 Antibiotika

Mehrere *Campylobacter*-Stämme, isoliert aus im Handel erhältlichem Geflügelfleisch, wurden hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber den Antibiotika Erythromycin, Ciprofloxacin und Tetracyclin getestet (SMOLE-MOZINA et al., 2009). In den Geflügelisolaten konnte eine weit verbreitete Resistenz nachgewiesen werden. 66,5 % der *Campylobacter*-Stämme insgesamt und alle überprüften *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämme wiesen eine Widerstandsfähigkeit gegenüber Ciprofloxacin auf. Die Resistenz gegenüber Erythromycin trat bei *C. coli* mit 34,5 % gegenüber den anderen 158 getesteten Stämmen mit 13,9 % am häufigsten auf. Eine Tetracyclinresistenz wurde nur selten beobachtet. Auch Multiresistenzen ließen sich nachgewiesen. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber einem oder mehreren Antibiotika ließ die Empfindlichkeit auf die untersuchten Desinfektionsmittel unbeeinflusst.

Das Nationale Referenzlabor für lebensmittelbedingte Zoonosen führte über mehrere Jahre ein Masthähnchenmonitoring durch, wobei neben der Nachweishäufigkeit von *Campylobacter* spp., die im Durchschnitt 36 % betrug, auch die Resistenzlage der gewonnenen Isolate auf gängige Antibiotika überprüft wurde. Dabei wurde sehr wohl eine Widerstandsfähigkeit von *C. jejuni* bzw. *C. coli* gegenüber Tetracyclinen (50 bzw. 61 %) festgestellt. Desweiteren ergaben sich Resistenzen gegenüber Ampicillin (39 bzw. 30 %), Ciprofloxacin (41 bzw. 60 %) und Nalidixinsäure (40 bzw. 61 %). Gegenüber Gentamicin erwiesen sich beide Spezies mit einer Sensibilität von 100 % als empfindlich (ELLERBROEK et al., 2009).

DESMONTS (2004) verglich die Empfindlichkeit von *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen aus Blinddarm- und Hautproben von französischen Broilern aus Freiland- und Intensivhaltung

gegenüber Ampicillin, Nalidixinsäure, Enrofloxacin, Tetracyclin, Erythromycin und Gentamicin in den Zeiträumen vor (1992-1996) und nach dem Verbot (2001-2002) von antimikrobiell wirksamen Wachstumsförderern wie Avoparcin, Virginiamycin, Tylosin, Spiramycin und Bacitracin. Diese Substanzen wurden in Frankreich allerdings bereits vor deren Interdikt bei Broilern aus Freilandhaltung traditionell nicht angewendet. Die Untersuchung erfolgte per Agardiffusionstest. Die Ergebnisse wurden bezüglich Spezies (*C. jejuni* oder *C. coli*), Haltungsform und Untersuchungszeitraum ausgewertet. Aus allen untersuchten Broilern konnten *Campylobacter* spp. isoliert werden. Im ersten Erhebungszeitraum, d. h. vor dem Verbot von antimikrobiell wirksamen Wachstumsförderern, zeigte sich *C. coli* im Vergleich zu *C. jejuni* nur resistenter gegenüber Erythromycin und Tetracyclin, während in der zweiten Untersuchungsperiode die *C. coli*-Isolate gegenüber allen überprüften antimikrobiell wirksamen Substanzen, mit Ausnahme von Gentamicin, widerstandsfähiger waren. Stämme, isoliert aus intensiv gehaltenen Broilern, wiesen häufiger Resistenzen auf als solche aus extensiver Haltung. Der prozentuale Anteil von Ampicillin-resistenten *C. jejuni*-Stämmen verringerte sich zwischen den beiden Untersuchungszeiträumen, während keine Veränderung ihrer Resistenzlage gegenüber den anderen getesteten Antibiotika feststellbar war. Allerdings nahm, wie o. g., die Resistenz von *C. coli*-Stämmen gegenüber Ampicillin, Nalidixinsäure, Enrofloxacin, Tetracyclin und Erythromycin in diesem Zeitraum signifikant zu.

In der ISO 10272:1995 (E) wurde die Differenzierung von thermophilen *Campylobacter* spp. u. a. aufgrund der Empfindlichkeit gegenüber Cephalothin und Nalidixinsäure im Agardiffusionstest vorgenommen (s. Tab. 3). Auch in der aktuellen Fassung von 2006 ist dies noch der Fall (s. Tab. 5). Hier wird aber auf die zunehmende Resistenzlage hingewiesen, weshalb dieses Kriterium eine schwer kalkulierbare Unsicherheit bei der differenzialdiagnostischen Auswertung darstellen dürfte.

RAHIMI et al. (2010) überprüften mittels Agardiffusionstest 50 *Campylobacter*-Isolate aus Fleischproben unterschiedlichen tierischen Ursprungs auf ihre Sensitivität bzgl. zehn verschiedener antimikrobieller Substanzen. Resistenzen gegenüber Tetracyclin waren mit 68,0 % dabei am häufigsten vertreten, gefolgt von solchen gegenüber Ciprofloxacin (46,0 %) und Nalidixinsäure (40,0 %). Alle Isolate reagierten empfindlich gegenüber Erythromycin, Gentamicin und Chloramphenicol.

Auch CHÂTRE et al. (2010) ermittelten eine hohe Tetracyclinresistenz bei *Campylobacter*-Isolaten, die aus Kotproben von Schlachtrindern stammten. 52,8 % der gewonnenen *C. jejuni*- und 88,1 % der *C. coli*-Isolate erwiesen sich als unempfindlich. Die Resistenzen der *C. jejuni*-Isolate standen dabei im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere. Aus 28,1 % der Kotproben von Kälbern, 5,8 % der Kotproben von Jungrindern und 4,8 % der Kotproben von Merzvieh wurde *C. jejuni* angezüchtet. Die aus Kälberkot gewonnenen Isolate erwiesen sich zu 78,1 % als nicht sensitiv gegenüber einem oder mehreren der getesteten Antibiotika, während nur 29,5 % bzw. 26,5 % der Jungrinder- bzw. Merzviehisolate sich resistent verhielten. Es musste festgestellt werden, dass ein Aufwärtstrend bzgl. der Resistenzlage von *C. jejuni*-Isolaten aus Kälberkot gegenüber Chinolonen und Fluorochinolonen bestand. So verhielten sich 2006 bereits 70,4 % der Isolate unempfindlich gegenüber Nalidixinsäure

(Chinolon). Die Resistenz gegenüber Fluorochinolonen, hier Ciprofloxacin, ist in den Jahren 2002 bis 2006 von 29,7 % auf ebenfalls 70,4 % angestiegen.

Bei der Entwicklung von selektiven Nährmedien zur Detektion von *Campylobacter* spp. haben sich 17 Antibiotika als besonders sinnvoll erwiesen, da sich *Campylobacter* spp. ihnen gegenüber als besonders unempfindlich verhalten, gleichzeitig aber die zu erwartende Begleitflora meist besonders sensitiv ist. Es handelt sich um Cephalothin, Cephalozin, Cefsulodin, Cephalexin, Cefoperazon, Trimethoprim, Polymyxin B, Colistin, Vancomycin, Teicoplanin, Rifampicin, Novobiocin, Bacitracin, Cycloheximid, Actidon, Amphothericin und Nystatin. Diese antimikrobiellen Substanzen werden daher in den meisten Nährmedien entweder allein oder in Kombination mit einem von fünf unterschiedlichen Cephalosporinen verwendet (SILLEY, 2003).

2.3.3.9 Bestrahlung

Nach einer Gamma-Bestrahlung in der Stärke 1,0 und 1,8 kGy von mit *Campylobacter* spp. kontaminiertem Geflügelfleisch ließen sich die Keime kulturell nicht mehr nachweisen (LEWIS et al., 2002). Jedoch ist die Empfindlichkeit von *Campylobacter* spp. gegenüber dieser Art von Strahlung sowohl abhängig von dem Medium, in dem sie sich befinden, als auch von der Spezies, um die es sich handelt (BHAVSAR et al., 2004). So beträgt die dezimale Reduktionszeit (D_{10} -Wert) für *C. sputorum* bzw. *C. coli* in Milch 2 KGy bzw. 1,17 KGy, während sie sich bei derselben Spezies im Medium Fleisch nur auf 0,5–0,6 KGy bzw. 0,2–0,4 KGy beläuft. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von PATTERSON (1995) überein, der die Sensitivität von *Campylobacter* spp. gegenüber Bestrahlung in Geflügelfleisch dokumentierte. Folglich haben auch bei der Strahlenbehandlung verschiedene Medien einen unterschiedlich starken protektiven Effekt auf die darin befindlichen Mikroorganismen.

Versuche von SINTON et al. (2007) zeigten, dass *C. jejuni* in durch Sonnenlicht bestrahltem Fluß- und Seewasser geringere Überlebensraten als *Salmonella enterica* oder *E. coli* aufweist. Daher ist die Übertragung von *C. jejuni* als krankmachendes Agens durch ein solches Gewässer im Gegensatz zu *S. enterica* eher unwahrscheinlich. Andererseits genügt laut ISOHANNI und LYHS (2009) die Bestrahlung von Broilerfleisch, -haut und -karkassen mit eigens dafür konzipierten UV-Licht-Geräten (254 nm) allein nicht, um *C. jejuni* so effektiv abzutöten, dass eine Infektionsgefahr weitestgehend ausgeschlossen bleibt. Es ist dabei allerdings anzunehmen, dass die vom Hersteller der UV-Geräte empfohlene Zeitspanne von maximal 18 s je nach Bestrahlungsintensität für eine signifikante Reduktion von *C. jejuni* zu kurz gewählt war.

2.4 Epidemiologie beim Tier

2.4.1 Vorkommen und Verbreitung

C. jejuni und *C. coli* kommen häufig als Kommensalen im Verdauungstrakt warmblütiger Haus- und Wildtiere vor, gelegentlich jedoch auch als Krankheitserreger bei deren

Jungtieren. Besonders häufig betroffen sind dabei Kälber, Lämmer und Welpen (SKIRROW, 1991). Im Verdauungstrakt von Schweinen kann *C. coli* deutlich häufiger als *C. jejuni* nachgewiesen werden.

Der Mensch stellt für *Campylobacter* spp. eher einen Neben- bzw. Zufallswirt dar. Humane Dauerausscheider kommen nur selten vor und bedeuten in den Industriestaaten nur ein geringes Infektionsrisiko (BLASER et al., 1983). Rohes Fleisch und andere Lebensmittel, die vom Tier stammen, bilden die Hauptquelle für Infektionen durch thermophile *Campylobacter*. Hervorzuheben sind dabei Geflügelprodukte aus konventioneller Herstellung. 50 % der *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen lassen sich allein auf deren Konsum zurückführen (SKIRROW, 1991). Frisches Hähnchenfleisch wurde 2008 in der EU durchschnittlich zu 30,1 % *Campylobacter*-positiv getestet. Truthahnfleisch und anderes Geflügelfleisch lag bei Werten zwischen 10,1 % und 21,9 %. Damit sind die Zahlen gegenüber den Vorjahren unverändert geblieben. Dagegen konnte in Proben von frischem Schweinefleisch (0,5 %) und Rindfleisch (0,3 %) eine Verminderung der Kontaminationsrate gegenüber den Vorjahren festgestellt werden. In allen anderen Lebensmitteln wurde *Campylobacter* nur gelegentlich detektiert. *Campylobacter*-kontaminiertes Hähnchenfleisch und Rohmilch erwiesen sich laut EFSA-Report als häufigste Ursachen für lebensmittelassoziierte *Campylobacteriose*-Ausbrüche (EFSA, 2010).

Eine *Campylobacter*-freie Broilerproduktion ist trotz größter Bemühungen und verschiedener Ansätze bislang nicht möglich, denn die Infektionsursachen von Broilerherden sind vielfältig. Es kann sich dabei um eine zu niedrige Biosicherheit in den Ställen, das Auftreten von keimausscheidenden Nagern oder Insekten (z. B. Fliegen), die als Vektoren dienen, ein fortgeschrittenes Alter der Broiler, die Verwendung von hygienisch nicht einwandfreiem Tränkwasser, kontaminierte Futtermittel oder auch andere Nutztiere in der Umgebung handeln (BLASER et al., 1983; JORE et al., 2010). Die *Campylobacter*-Kontamination zeigte bei einer in Deutschland durchgeführten Untersuchung von 51 Broilerherden aus drei regional unterschiedlich angesiedelten Mastbetrieben saisonale Unterschiede. Dabei war in den Sommermonaten von Juni bis August die höchste Prävalenz zu verzeichnen. In jeder positiven Herde konnten ein bis drei differierende Genotypen nachgewiesen werden. Diese saisonale Abhängigkeit besteht jedoch nicht weltweit und konnte durch Studien in den USA, Großbritannien und Kanada nicht bestätigt werden (ELLERBROEK et al., 2010). Zugleich zeigte sich die Höhe der Kontaminationsraten von Broilerherden abhängig von den Aussentemperaturen, Niederschlagsmengen und der herrschenden Windstärke. Ausserdem konnte festgestellt werden, dass in Folge einer hohen Prävalenz in den Masthähnchenherden die Inzidenz von Erkrankungen beim Menschen steigt (HARTNACK et al., 2009). Bei einem Feldversuch mit parallel aufgestellten Gelügelherden konnte festgestellt werden, dass in den meisten *Campylobacter*-positiven Broilerherden ein Genotyp vorherrscht, jedoch in einer Herde grundsätzlich mehrere Typen vorkommen, was ein Hinweis auf verschiedene Eintragsquellen ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Genotypen sich in ihrer Widerstandsfähigkeit und auch in ihrem Potenzial zur Kolonisation unterscheiden und sich so auch gegenseitig verdrängen können (ALTER et al., 2011). Es konnten drei Risikofaktoren identifiziert werden, welche die Kolonisation einer Herde wahrscheinlich machen. Die *Campylobacter*-Prävalenz war deutlich höher bei

Freilandhaltung oder bei biologischen Haltungsformen, Herdengrößen von bis zu 15.000 oder mehr als 25.000 Tieren und bei der Verwendung von Nippeltränken (NÄTHER et al., 2009).

Bei dem Schlachtprozess infizierter Herden findet eine Kontamination der Karkassen durch den Darminhalt statt (BLASER et al., 1983). Eine Kreuzkontamination nahezu aller Gerätschaften und der Umgebung auf jeder Ebene der Schlachtlinie ist zu erwarten, sobald eine *Campylobacter*-positive Broilerherde im Schlachtbetrieb verarbeitet wird (ELLERBROEK et al., 2010). Auf Barbados wurde eine Kontaminationsrate bei Broilerkotproben von 94,2 % festgestellt, wobei alle *Campylobacter*-negativen Resultate von Broilern stammten, die nicht älter als drei Wochen waren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass *Campylobacter* spp. zur normalen Keimflora des Broilerdarmes gehören und die Besiedlung in einem Alter zwischen zwei und drei Wochen stattfindet (WORKMAN et al., 2005).

Eine weitere Datenerhebung auf Barbados ergab, dass Hähnchenfleisch zu 79,8 % mit *Campylobacter* spp. behaftet war. Dabei handelte es sich zu 86,6 % um *C. jejuni* (WORKMAN et al., 2005). Dem gegenüber steht eine Nachweisrate von 36 % bei Broilerkotproben in Dänemark (NIELSEN et al., 1997). 2008 lag die durchschnittliche Prävalenz von *Campylobacter*-positiven Masthähnchenherden in Europa bei 24,7 % und variierte je nach Mitgliedsstaat zwischen 6,5 % und 79,0 %. Die niedrigste Prävalenz ließ sich in Finnland und Schweden feststellen. Nur drei EU-Mitgliedsstaaten übermittelten Werte bezüglich Mastschweineherden (37,3 %–67,8 %) und Rinderherden (0 %–61,3 %). Trotz der hohen Prävalenz beim lebenden Tier, die mit den Vorjahren vergleichbar war, erwiesen sich rohes Schweine- und Rindfleisch im Handel nur geringgradig mit thermophilen *Campylobacter* behaftet. Im Jahre 2008 wurden in rohem Hähnchenfleisch zu 41,2 % *C. jejuni*, zu 23,7 % *C. coli* und zu 0,1 % *C. lari* nachgewiesen. 35,4 % der Isolate wurden nicht näher spezifiziert (EFSA, 2010).

Mehr als die Hälfte aller Mastschweine in den Niederlanden, Deutschland und den USA beherbergen *Campylobacter* als Kommensalen in ihrem Verdauungstrakt und scheiden diesen Keim auch aus. Vornehmlich handelt es sich bei den nachgewiesenen Isolaten um *C. coli* und nur in seltenen Fällen um *C. jejuni*. Daraus resultiert eine deutlich höhere Kontaminationsrate von Schweinehälften als bei Rinder- oder Schafschlachtkörpern, die allein von einer Verunreinigung durch den Darminhalt herrührt (BLASER et al., 1983). Regional können mittlerweile weitaus höhere Kontaminationsraten festgestellt werden; so zeigte eine Studie von WORKMAN et al. (2005) eine Prävalenz von 90,5 % bei Hausschweinen, wobei auch hier *C. coli* mit einem Anteil von 98,4 % deutlich dominierte. Dagegen konnte bei einer Untersuchung von 153 Wildschweinen in der Schweiz kein einziges Tier als *Campylobacter*-positiv detektiert werden (WACHECK et al., 2010). Auch 2008 war die hauptsächlich bei Hausschweinen nachgewiesene *Campylobacter* spp. in der EU *C. coli* (88,8 %). *C. jejuni* (2,6 %) machte nur einen geringen Anteil aus und in 8,5 % der Fälle wurde die Spezies nicht näher definiert (EFSA, 2010).

C. jejuni tritt beim Rind ebenfalls als Kommensale auf, wobei sich in der warmen Jahreszeit positive Nachweise aus Kotproben häufen; die Zahlen nehmen dann in den Wintermonaten wieder ab. Derselbe Serotyp kann über Monate oder auch zeitlebens mit dem Kot

ausgeschieden werden. Eine Übertragung des Erregers auf das Kalb ist durchaus möglich, jedoch konnte ein horizontaler Übertragungsweg nicht beobachtet werden. Durch Darminhalt verunreinigte Schlachtkörper vom Rind sind selten, und der Kontaminationsgrad fällt dabei meist gering aus. Rohmilch wurde schon häufiger mit Krankheitsausbrüchen durch *Campylobacter* in Verbindung gebracht. Es handelt sich dabei entweder um eine fäkale Kontamination der Milch oder eine primäre Kontamination beim Vorliegen einer *Campylobacter*-assoziierten Mastitis. Allerdings liefert eine *Campylobacter*-positive Milchviehherde nicht zwangsweise auch kontaminierte Milch (BLASER et al., 1983).

Eine Untersuchung von 2.255 Kotproben in Frankreich ergab eine Kontaminationsrate mit *Campylobacter* von 16,5 %, davon 12,8 % *C. jejuni* und 3,7 % *C. coli*. Die Proben waren in Schlachthöfen neun verschiedener Departements von Kälbern, Jungrindern und Merzvieh gewonnen worden (CHÂTRE et al., 2010). NIELSEN et al. (1997) stellten dagegen bei Rindern, die auf dem Schlachthof untersucht wurden, deutlich höhere Besiedlungsraten von 47 % fest. Andererseits konnte in keiner der auf Barbados untersuchten Rinderkotproben *Campylobacter* nachgewiesen werden (WORKMAN et al., 2005). Aktuellere Studien beim Rind zeigen ein Vorkommen von *C. jejuni* von 83,0 %, *C. coli* 7,3 % und sonstige bzw. nicht weiter spezifizierte *Campylobacter* von 9,7 % (EFSA, 2010).

C. jejuni ist beim Schaf ein bedeutsamer Verursacher des seuchenhaften Verwerfens. Ohne klinische Folgen tritt der Mikroorganismus zugleich bei vielen Herden als Kommensale im Verdauungstrakt auf. Trotz des häufigen Vorkommens bleibt eine Kontamination des Schlachtkörpers durch *Campylobacter* spp. eher die Ausnahme (BLASER et al., 1983). Eine Untersuchung im Iran von 2008 bis 2009 ergab, dass Lammfleisch im Vergleich zu anderen Fleischsorten der Studie mit 12 % im Durchschnitt und in den Frühlingsmonaten mit bis zu 20 % die höchste Kontaminationsrate aufwies. Dem gegenüber dazu waren Kamelfleisch zu 0,9 %, Rindfleisch zu 2,4 % und Ziegenfleisch zu 9,4 % belastet. Insgesamt wurde bei den 722 untersuchten Fleischproben eine Prävalenz von 6,9 % festgestellt. In 84 % der Fälle handelte es sich dabei um *C. jejuni* und zu 16 % um *C. coli* (RAHIMI et al., 2010). WORKMAN et al. (2005) stellten ein *Campylobacter*-Vorkommen im Schafkot von lediglich 4,2 % fest, was auf ein geringes Kontaminationsrisiko für das Schaffleisch schließen läßt. Die verschiedenen Studien zeigen, dass sich bedingt durch beispielsweise unterschiedliche klimatische und jahreszeitliche Verhältnisse, Hygienestandards oder auch Haltungsbedingungen des jeweiligen Landes abweichende Resultate ergeben.

In der EU wurden in den Jahren 2007–2008 zwischen 0 % und 13,2 % der Schafe je nach Mitgliedsstaat *Campylobacter*-positiv getestet (EFSA, 2010).

Im Kot von gesunden wie auch an Durchfall erkrankten Haushunden kann oftmals *C. jejuni* gefunden werden. Der Nachweis erfolgt jedoch häufiger bei Tieren aus einer Gruppenhaltung oder Welpen als bei einzeln gehaltenen Familienhunden bzw. adulten Tieren. Ähnlich stellt sich die Situation bei Hauskatzen dar. Die Positivrate fällt auch hier unter Katzenwelpen bzw. Zuchtpopulationen höher als bei Einzeltieren aus (BLASER et al., 1980; BRUCE et al., 1980). Im Vergleich dazu wurde auf Barbados eine Ausscheidung von *Campylobacter* spp. von 46,9 % bei Hunden, die meist asymptomatisch verlief, und 37,3 % bei Katzen nachgewiesen, wobei Hunde zu 51,5 % *C. jejuni* und Katzen hauptsächlich

C. upsaliensis und *C. helveticus* in ihrem Verdauungstrakt beherbergten. 50 % der untersuchten Hunde mit Parvovirose waren auch *Campylobacter*-positiv (WORKMAN et al., 2005). Diese regionalen Unterschiede sind wahrscheinlich auf die differierenden Haltungsbedingungen zurückzuführen.

Katzen waren 2008 in Deutschland zu 2,0 % *Campylobacter*-positiv und Hunde zu 5,9 % (EFSA, 2010).

Nagetiere, wie Ratten, Mäuse oder Hamster, stellen gelegentlich Ausscheider von *Campylobacter* spp. dar (FERNIE und PARK, 1977).

Bei Primaten sind *Campylobacter*-Infektionen häufig anzutreffen. Hierbei konnten bei 18 % der neuimportierten gesunden Tiere und bei 60 % von an Durchfall erkrankten Affen *Campylobacter* nachgewiesen werden. Eine ähnlich hohe Zahl (17 %) wurde bei Primaten auf Barbados festgestellt. Bei anderen im Zoo gehaltenen Tieren wie Feliden (2 %) und auch Paarhufern (6 %) gilt ein *Campylobacter*-Nachweis als eher selten. Im Zoo gehaltene Tauben (17 %) und andere Vögel (10 %) wiesen deutlich höhere Infektionsraten auf (BLASER et al., 1983; TRIBE et al., 1979; WORKMAN et al., 2005). Bei Wildvögeln fand sich eine noch höhere Prävalenz von 39,3 % (WORKMAN et al., 2005).

Bislang gibt es keinen Fall, in dem Reptilien als Wirt von *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden, was mit größter Wahrscheinlichkeit daran liegt, dass *Campylobacter* spp. bei Temperaturen unter 30 °C nicht mehr vermehrungsfähig sind (BLASER et al., 1983). Da diese vergleichsweise niedrigen Temperaturen bei wechselwarmen Tieren wie Reptilien zuweilen vorkommen, wird in diesen Zeiträumen die minimale Temperatur, bei der *Campylobacter* noch vermehrungsfähig wäre, nicht erreicht.

Arthropoden können als mechanische Vektoren für die Keimverbreitung eine Rolle spielen (SHIMSHONY, 2009).

2.4.2 Klinik

Bei den meisten Tieren verläuft eine *Campylobacter*-Infektion bzw. -Kolonisation asymptomatisch. Eine Erklärung dafür lautet, dass der Mikroorganismus als Bestandteil der natürlichen Flora den Darm kolonisiert hat. Treten Erkrankungserscheinungen auf, so handelt es sich dabei um Diarrhoe, wobei z. T. mindestens ein weiterer pathogener Keim nachweisbar ist. Erkrankungen sind zumeist bei Jungtieren anzutreffen. Bei adulten Tieren treten *Campylobacter* spp. tierartspezifisch auf. Es handelt sich hierbei um ein Vorkommen des Mikroorganismus als Kommensale im Verdauungstrakt. Das Wirtstier wird dann meist zum Dauerausscheider. Symptome einer Enteritis beim adulten Tier können sich bei Stress oder Superinfektion einstellen (BLASER et al., 1983; FERNIE und PARK, 1977; NIELSEN et al., 1997; SHIMSHONY, 2009; WORKMAN et al., 2005).

Bei Hunden wurden Symptome wie Diarrhoe, Erbrechen, Appetitmangel und gelegentlich Fieber beobachtet. Im Allgemeinen halten die Beschwerden drei bis sieben Tage an. Einige Tiere zeigen wiederkehrende Diarrhoe über Wochen bis Monate. Der Kot von erkrankten Kälbern ist meist mukös und dickflüssig mit gelegentlichen Blutbeimengungen. Fieber tritt

auch hier von Fall zu Fall auf. Auch bei Katzen, Primaten, Nerzen und Frettchen kommt es im Erkrankungsfall zu wässrigen, mukösen, bisweilen blutigen Durchfällen. Frisch geschlüpfte Küken zeigen nach einer Infektion sehr schnell Symptome einer Diarrhoe und verenden, wohingegen Geflügel, das älter als eine Woche ist, normalerweise nicht erkrankt. Eine Geflügelherde kann binnen 72 h nach Erregereintritt in die Population komplett durchseucht sein (CENTER FOR SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2005; SHIMSHONY, 2009).

Eine Infektion durch *C. jejuni* und *C. coli* ist u. a. bei Rindern, Schafen, Geflügel, Hunden, Katzen, Nerzen, Frettchen, Schweinen und Primaten anzutreffen. Einige *C. jejuni*-Stämme, *C. fetus* ssp. *fetus* und *C. fetus* ssp. *venerealis* sind ursächlich für Infertilität und Aborte bei Schaf und Rind. Beim Rind rufen *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus* eine genitale Campylobacteriose hervor, welche sich durch Infertilität und frühes Embryonalsterben äußert. *Campylobacter*-assoziiertes Verkälben kommt vor, ist aber selten. Infizierte Kühe zeigen eine schleimig-eitrige Endometritis, meist ohne weitere Symptome. *Campylobacter* steht auch im Verdacht als möglicher Mastitiserreger. Bullen mit genitaler Campylobacteriose sind symptomlos. Bei Schafen kann eine Infektion mit *C. fetus* ssp. *fetus* und *C. jejuni*, wie oben bereits erwähnt, zu späten Aborten, Totgeburten oder auch lebensschwachen Neugeborenen führen. Infektionen verursachen zuweilen eine tödlich verlaufende Metritis. Jedoch ist eine vollständige Rekonvaleszenz der Tiere mit Ausbildung einer Immunität die Regel (CENTER FOR SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2005; SHIMSHONY, 2009).

2.4.3 Therapie und Prävention

Eine Applikation von entsprechend wirksamen Chemotherapeutika kann bei einer durch *Campylobacter* verursachten Enteritis sinnvoll sein, wird jedoch nur selten durchgeführt. In der Regel beschränkt sich die Therapie auf eine symptomatische Behandlung mit Flüssigkeits- und Elektrolytersatz. Eine Schutzimpfung gegen die enteritische Form der Campylobacteriose steht nicht zur Verfügung. Allerdings wird die Impfung gegen das seuchenhafte Verwerfen beim Schaf erfolgreich eingesetzt. Eine Vakzinierung wird auch beim Rind sowohl zur Vorbeugung als auch zur Behandlung der genitalen Campylobacteriose angewendet. Vakzinierte Rinder können jedoch weiterhin Träger des Mikroorganismus bleiben.

In Geflügelbetrieben, wie auch bei Schafherden, bildet ein gutes Hygiene- und Herdenmanagement die wichtigste Voraussetzung zur Prävention von *Campylobacter*-Infektionen bzw. der Darmkolonisation. Die Maßnahmen beinhalten neben der Verwendung hygienisch einwandfreien Futters und Trinkwassers auch das effektive Fernhalten von Nagern und Wildvögeln bei der Geflügelproduktion. Die Insektenpopulation sollte so gering wie möglich gehalten werden. Ebenso können Herdenmanagementsysteme wie all in/all out und Dekontaminationseinrichtungen zwischen den einzelnen Stallungen ein Infektionsrisiko verringern (CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2005; SHIMSHONY, 2009).

2.4.4 Reservoirs

Thermophile *Campylobacter* spp. sind in der Natur weit verbreitet. Hauptreservoir ist der Verdauungstrakt von sowohl Wild- und Hausgeflügel als auch Wild- und Haussäugetieren. Sie kommen außerdem häufig bei lebensmittelliefernden Tieren wie Geflügel, Rindern, Schweinen und Schafen vor. Wie oben bereits erwähnt, sind davon durchaus auch kleine Haustiere wie Hunde und Katzen betroffen. Oberflächengewässer und damit auch insbesondere Wassergeflügel stellen ebenso ein Reservoir dar (EFSA, 2009).

2.5 Epidemiologie beim Menschen

2.5.1 Vorkommen und Verbreitung

Die *Campylobacter*-Enteritis ist weltweit die häufigste bakterielle Form von infektiöser Diarrhoe in den Industriestaaten. In diesem Zusammenhang werden überwiegend die Spezies *C. jejuni* und *C. coli* isoliert.

Eine alimentäre Infektion durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel, meist tierischen Ursprungs, oder Wasser, ist als Hauptinfektionsursache des Menschen zu betrachten (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010).

Es können verschiedene Lebensmittel mit thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert sein. Häufig betroffen sind dabei rohes Fleisch, insbesondere Geflügelfleisch, Rohmilch und Rohmilcherzeugnisse, eher selten Fisch und Fischereierzeugnisse, Muscheln und rohes Gemüse. Auslöser von sporadisch auftretenden Erkrankungsfällen bilden der Kontakt mit lebendem Geflügel und anderen Tieren sowie der Konsum von Geflügelfleisch und hygienisch nicht einwandfreiem Wasser. Größere Krankheitsausbrüche sind meist auf den Verzehr von Rohmilch und kontaminiertem Trinkwasser zurückzuführen (EFSA, 2009).

Der Mensch stellt in den Industriestaaten kein nennenswertes Reservoir von *Campylobacter* spp. dar, weil eine Erregerausscheidung ohne klinische Symptome bzw. eine Erregerdauer-ausscheidung die Ausnahmen bilden. In Entwicklungsländern mit niedrigen Hygienestandards spielt dieser Faktor eine gewichtigere Rolle (BLASER et al., 1983).

Die Übertragung von *Campylobacter* spp. kann durch direkten Kontakt mit kontaminierten unbelebten Objekten oder mit infizierten Tieren und Menschen geschehen. Es wurden Krankheitsfälle von Kindern und Jugendlichen dokumentiert, die auf einen unmittelbaren, engen Kontakt zu infizierten Welpen zurückgeführt werden konnten. Die Übertragung von *Campylobacter* spp. durch Haushunde, insbesondere Jungtiere, ist häufiger als die durch Hauskatzen. In einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren in Großbritannien konnten nur drei Krankheitsausbrüche beim Menschen auf eine Übertragung durch Hauskatzen, dagegen 61 durch Haushunde zurückgeführt werden (SKIRROW et al., 1980).

2008 blieb die Campylobacteriose in der Europäischen Union mit 190.566 dokumentierten Fällen auch weiterhin die häufigste Form von infektiöser, bakterieller Gastroenteritis, obwohl ein Rückgang um 5,0 % zum Vorjahr zu verzeichnen war. EU-weit war die Erkrankungsrate

bei Kindern unter fünf Jahren mit 105 Fällen pro 100.000 Einwohner am höchsten. Bei allen anderen Altersgruppen bewegte sich der Wert zwischen 30 und 47 Fälle pro 100.000 Einwohner. Demgegenüber steht als zweithäufigste Zoonose 2008 die Salmonellose mit 131.468 dokumentierten Fällen (EFSA, 2010).

Bei der *Campylobacter*-Enteritis handelt es sich in Deutschland um eine meldepflichtige Erkrankung. Mit 62.789 Erkrankungen im Jahre 2009 ist sie die häufigste der bakteriell bedingten Durchfallerkrankungen. Verglichen mit den Zahlen des Vorjahres kann von einem 3 %-igen Rückgang und einer Gesamtinzidenz von rund 76,6 Erkrankungsfällen pro 100.000 Einwohner ausgegangen werden. Damit platzierte sich die Campylobacteriose auf Platz zwei der dem Robert Koch-Institut gemeldeten Erkrankungen nach den Norovirus-Infektionen. Die meisten Fälle wurden dabei im zweiten und dritten Quartal des Jahres übermittelt und zeigen somit – wie auch in den Jahren zuvor – eine saisonale Abhängigkeit. Die geografische Verteilung der Krankheitsausbrüche erscheint heterogen, allerdings gibt es Kreise mit überdurchschnittlich hoher Inzidenz in den neuen Bundesländern. Demografisch war die Inzidenz der ein- bis zweijährigen Kinder (174,1 bzw. 129,6 Erkrankungen/100.000 Einwohner) am höchsten. Es folgen die Gruppe der 20- bis 24-jährigen (119,5 Erkrankungen/100.000 Einwohner), der Kinder unter fünf Jahren (109,0 Erkrankungen/100.000 Einwohner) und den 25- bis 29-jährigen (107,2 Erkrankungen/100.000 Einwohner). Die Infektion trat häufiger bei männlichen Personen auf (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010).

Bei 77 % der Campylobacteriosen konnte eine Speziesdifferenzierung erfolgen, wobei in 70 % der Fälle *C. jejuni*, in 23 % der Fälle *C. jejuni* oder *C. coli* und in 6 % der Fälle *C. coli* ursächlich für die Erkrankung waren. Andere *Campylobacter* spp. wurden zu weniger als 1 % identifiziert (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010). Die statistischen Auswertungen anderer Länder, wie z. B. England, fallen ähnlich aus (O'BRIEN, 2003). WORKMAN et al. (2005) stellten ein Vorkommen von *C. jejuni* bei 63,6 % der an Campylobacteriose erkrankten untersuchten Personen fest (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2010).

Eine Studie der British Infection Society befasste sich mit den Inzidenzen unterschiedlicher in Großbritannien lebender ethnischer Gruppen. Es stellte sich dabei heraus, dass die pakistanische Gemeinschaft ein höheres Risiko aufweist, an einer Campylobacteriose zu erkranken, als alle anderen untersuchten Gruppen, obwohl bei diesen Personen der Verzehr von Geflügel- und rotem Fleisch durchschnittlich niedriger ausfiel und auch Kontakte zu Tieren seltener waren als bei anderen Gruppen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Infektionswege bei unterschiedlichen ethnischen Gemeinschaften differieren. Menschen, die sich selbst zu der Gruppe der Inder bzw. Schwarzafrikaner zählten, waren nach dieser Untersuchung am wenigsten gefährdet, an einer *Campylobacter*-Infektion zu erkranken (O' BRIEN, 2003).

2.5.2 Klinik

Bei der *Campylobacter*-Enteritis handelt es sich um eine akute Durchfallerkrankung, die in der Regel mit Bauchschmerzen, Fieber, Erbrechen, Kopf- und Muskelschmerzen sowie

wässrigem, gelegentlich auch blutigem Durchfall einhergeht. Durch die klinische Symptomatik allein ist eine Darminfektion durch *Campylobacter*, zumeist verursacht durch *C. jejuni* oder auch *C. coli*, von einer Shigellose oder Salmonellose nicht eindeutig abzugrenzen (BLASER und ENGBERG, 2008; SKIRROW, 1990). Die Differentialdiagnose erfordert einen Keimnachweis in einer entsprechenden Stuhlprobe oder einen Antikörpernachweis im Blut. Letzterer ist überwiegend nach Abklingen der Symptome möglich. Bei einer systemischen Erkrankung kann auch eine Anzucht des Erregers aus einer Blutkultur erfolgen (WEINKE und LIESENFELD, 2008).

Pathologische Veränderungen treten in Form einer akuten Entzündung des Grimm- und Enddarmes auf. Besonders häufig betroffen sind weiterhin der distale Teil des Krummdarmes, der Blinddarm und die dazugehörigen Mesenteriallymphknoten. Um eine Infektion des Darmes überhaupt verursachen zu können, müssen lebende Mikroorganismen die Säureschranke des Magens überwinden. Die Kolonisation von Dünn- und Krummdarm wird durch eine Anhebung des Magensäure-pH-Wertes, z. B. infolge einer Antacidum-Therapie, deutlich begünstigt. Die Kolonisation der Darmmucosa durch *Campylobacter* spp. ist nur bei uneingeschränkter Beweglichkeit und funktionsfähigem Anheftungsmechanismus an die Mucosazellen möglich (BLASER und ENGBERG, 2008).

Antikörper sind im Blutserum infizierter Personen ab dem fünften Erkrankungstag erfassbar und erreichen ihren Maximalwert innerhalb von zwei bis vier Wochen. Erst nach mehreren Monaten ist ihr Nachweis im Serum nicht mehr möglich. Zudem werden auch intestinal Antikörper gebildet. Nach überstandener Infektion ist daher eine kurzfristige Immunität zu beobachten und eine Reinfektion durch einen homologen Stamm erst wieder nach sechs bis 18 Monaten möglich. Über die konkrete Dauer der entstandenen Immunität und deren Effektivität nach einmaliger Infektion können keine Aussagen getroffen werden (BLASER und ENGBERG, 2008).

Die minimale Infektionsdosis wird von vielen Faktoren beeinflusst, ist aber meist relativ gering und liegt bei etwa 500 Mikroorganismen (BLASER und ENGBERG, 2008). Bereits ROBINSON (1981) stellte eine krankheitsauslösende Minimaldosis von 500 Keimen bei der Aufnahme zusammen mit 180 ml Milch fest. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich zwei bis fünf Tage, in Einzelfällen auch ein bis zehn Tage (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2005; EFSA, 2010). Menschen jeder Altersstufe können dabei betroffen sein (BUTZLER und OOSTEROM, 1991). Der Schweregrad des Krankheitsverlaufes wird stark von der Infektionsdosis, dem infizierenden Stamm und der Immunabwehr des Patienten bestimmt. Im Allgemeinen verläuft eine Infektion wie folgt: Es treten plötzlich krampfartige Bauchschmerzen auf, denen in Kürze Durchfälle folgen, wobei 30 % der Patienten initial ein oder mehrere grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Schwindel und/oder Muskelschmerzen entwickeln. Für Darminfektionen eher untypische, gelegentlich auftretende Symptome wie Fieberkrämpfe, Delirium und Meningismus bei fehlendem Abdominalschmerz können zu Fehldiagnosen führen, wobei der Schweregrad der Erkrankung in diesen Fällen meist höher ist. Nach einer Durchfallperiode von drei bis vier Tagen bessert sich der Allgemeinzustand stetig, allerdings bleiben die Abdominalschmerzen noch ein paar Tage darüber hinaus bestehen. Falls keine antibiotische Therapie erfolgt, wird der Erreger noch zwei bis drei

Wochen nach Abklingen der klinischen Symptome mit dem Stuhl ausgeschieden. Eine Dauerausscheidung konnte bislang ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten festgestellt werden (BLASER und ENGBERG, 2008; SKIRROW, 1990).

Der Krankheitsverlauf ist von vielen Faktoren, wie Immunstatus des Patienten zum Zeitpunkt der Infektion, Virulenz des infizierenden Stammes usw., abhängig und ermöglicht keine genaue Definition des Schweregrades einer *Campylobacteriose*. Bei der Untersuchung verschiedener Krankheitsausbrüche wurden Zeitangaben von 3,8 bis 14,6 Tagen als arbeitsunfähige Periode angegeben. Für 0,5–32 % der betroffenen Patienten war ein Krankenhausaufenthalt unumgänglich. Neben einigen in der Literatur beschriebenen, eher seltenen intestinalen Komplikationen (z. B. Blind- und Dickdarmentzündungen, toxischem Megacolon, Darmblutungen) können in Einzelfällen auch extraintestinale Begleiterkrankungen wie Bakteriämie, milde bis deutliche, jedoch vollständig ausheilende Leberentzündung sowie Gallenblasen-, Bauchspeicheldrüsen-, Nieren-, Bauchfell- und Herzmuskelentzündungen auftreten, dies aber meist in Verbindung mit einer Vorerkrankung oder zusätzlicher Infektion mit einem weiteren pathogenen Erreger (beispielsweise Salmonellen) (BLASER und ENGBERG, 2008; SKIRROW et al., 1993).

Als Spätfolge einer *Campylobacteriose* treten in 1–5 % der Krankheitsfälle nach drei Tagen bis zu sechs Wochen reaktive Arthritiden, vergleichbar mit den gelegentlich nach überstandener Salmonellose vorkommenden Beschwerden, auf. Meist ist jedoch von einer vollständigen Genesung der Betroffenen innerhalb einiger Wochen auszugehen. Nur im Einzelfall dauert es bis zu einem Jahr, ehe die Erkrankung überstanden ist. Eine weitere Spätfolge, die zumeist mit der zuvor genannten reaktiven Arthritis assoziiert ist, stellt das REITER-Syndrom dar. Außerdem läßt sich in einigen Fällen das Auftreten eines GUILLAIN-BARRÉ-Syndroms auf eine vorausgegangene *Campylobacter*-Enteritis zurückführen (BLASER und ENGBERG, 2008; POPE et al., 2007).

2.5.3 Therapie

In den meisten Erkrankungsfällen, denen eine Infektion durch *Campylobacter* zugrunde liegt, ist keine spezifische Therapie von Nöten. Im Regelfall gilt eine Substitution der aufgrund von Durchfall und Erbrechen verlorenen Flüssigkeit und von Elektrolyten als vollkommen ausreichend. Zudem kann eine antimikrobielle Therapie auf Grundlage des bakteriologischen Erregernachweises erst dann eingeleitet werden, wenn die meisten Patienten sich bereits auf dem Wege der Besserung befinden, was daran liegt, dass der untersuchende Arzt oftmals erst einige Tage nach Beginn der Erkrankung aufgesucht wird und somit der Erregernachweis dem Krankheitsverlauf hinterher hinkt. Frühe Antibiotikagaben verkürzen den Krankheitsverlauf und vermeiden eine Erregerausscheidung mit dem Stuhl (BLASER und ENGBERG, 2008).

Für die antimikrobielle Therapie werden als erste Wahl Erythromycin oder auch Fluorchinolone angewendet. Die zunehmende Resistenz muss dabei beachtet werden. Als Reserveantibiotika stehen Tetracyclin und Chloramphenicol zur Verfügung. Eine antimikrobielle Therapie ist nur dann angezeigt, wenn sich der Patient im akuten Stadium der

Erkrankung befindet, keine Anzeichen von Besserung zeigt und ungewöhnlich massive Symptome bzw. Komplikationen oder Anzeichen einer systemischen Infektion aufweist. Immunsuppression oder andere Prädispositionen für Infektionserkrankungen gelten ebenfalls als Risikofaktoren. Außerdem werden in der Regel Personen antimikrobiell behandelt, von denen die Gefahr einer Weiterverbreitung der Infektion ausgeht (BLASER und ENGBERG, 2008; SKIRROW, 1990).

2.6 Nachweisverfahren für thermophile *Campylobacter*

Aufgrund ihres Wachstumsoptimums bei 42 °C werden die *Campylobacter* spp. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* als thermophil bezeichnet (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2010).

Meistens erfolgt der Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. mittels einer Anreicherung mit anschließender Kultivierung auf Selektivnährböden nach DIN EN ISO 10272. Wegen der hohen Anforderungen von *Campylobacter* spp. an die Wachstumsbedingungen, den meist geringen Keimzahlen im zu untersuchenden Material bei gleichzeitigem Auftreten einer vielfältigen Begleitflora und der nicht selten bestehenden subletalen Schädigung der Keime gestaltet sich deren kultureller Nachweis sehr aufwendig, zeitraubend und teilweise problematisch. Daher wird ständig an einer Verbesserung der Analytik gearbeitet, und es werden immer wieder neue Schnellmethoden basierend auf unterschiedlichen Verfahren, wie z. B. PCR, Sondeneinsatz, ELISA usw., zum Screening von Lebensmitteln und zur Aufklärung von Krankheitsausbrüchen beim Menschen entwickelt. Allerdings bedürfen auch diese Schnellverfahren in der Regel einer Voranreicherung.

2.6.1 Kulturelle Nachweisverfahren

Für die Untersuchung von Lebensmitteln auf *Campylobacter* spp. werden meist Nährmedien verwendet, die ursprünglich für die Untersuchung von Stuhlproben auf *C. jejuni* entwickelt wurden. Diese bestehen grundsätzlich aus einem nährstoffreichen Basismedium in Kombination mit einer Mischung verschiedener Antibiotika, um die häufig vielfältige Begleitflora zu unterdrücken. Weiterhin wird eine Kombination aus Substanzen zum Schutz vor toxischen Sauerstoffderivaten zugesetzt. Durch die Weiterentwicklung der Medien ist es nunmehr möglich, *Campylobacter* spp. z. T. bei einer Temperatur von 37 °C an Stelle von 42 bzw. 43 °C anzuzüchten. Auch finden immer wieder Anpassungen von Konzentration und Art antibiotisch wirksamer Substanzen statt, um zu verhindern, dass *Campylobacter* spp. selbst im Wachstum gehemmt werden. Bei der Auswahl der Zutaten wird versucht, eine gegen die Begleitflora möglichst hoch wirksame und zugleich gegen *Campylobacter* spp. unwirksame Substanz bzw. Substanzkombination einzusetzen, wobei natürlich nur die Resistenz der überprüften Stämme gewährleistet werden kann. Zur Hemmung der Begleitflora in den Nährmedien werden Cephalosporine, und hier mittlerweile eher Cefoperazon als Cephalothin, da letzteres insbesondere auf *C. coli* hemmend wirken kann, eingesetzt sowie Trimethoprim, Polymyxin B, Vancomycin, Rifampicin, Novobiocin, 5-Fluorouracil, Bacitracin und Antimycotika (CORRY et al., 2003). Es gilt als bewiesen, dass

sich sowohl einige Stämme von *C. coli* als auch solche von *C. jejuni* aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber dem im Nährmedium enthaltenen Cephalothin nicht detektieren ließen (BROOKS et al., 1986; ENDTZ et al., 1991; NG et al., 1985b; NG et al., 1988). Die sorgfältige Auswahl des Selektivmediums ist auch beim Nachweis von *C. upsaliensis* ausschlaggebend, weil die meisten gebräuchlichen Nährmedien für diese Art hemmende Substanzen enthalten.

Bebrütungstemperaturen zwischen 42 und 43 °C erschweren die Detektion einiger *C. fetus* ssp. *fetus*- und *C. upsaliensis*-Stämme außerordentlich. Der Nachweis gelingt hier nur bei der Anwendung von eigens für diese Subspezies entwickelten blutfreien Selektivmedien oder Membranfiltersystemen in Kombination mit nicht selektiven festen Nährmedien bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C. Auch sind einige Stämme von *C. jejuni* ssp. *doylei* nicht zum Wachstum bei 42 °C befähigt. Um diesen Temperatursprüchen genüge zu tun, geht der Trend dahin, die Bebrütungstemperatur auf 37 °C zu senken (CORRY et al., 2003).

Da *Campylobacter* spp. höchst empfindlich auf Sauerstoffderivate reagieren, enthalten die gebräuchlichen Nährmedien entsprechende protektive Substanzen. Stoffe wie lysiertes oder defibriniertes Blut, eine Kombination aus Eisen(II)sulfat, Natriumbisulfit und Natriumpyruvat (FBP) sowie Hemin oder Hämatin und Aktivkohle eignen sich für diesen Zweck. Die Systeme werden teilweise auch in Kombination und in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die meisten festen und auch einige flüssige Nährböden enthalten Blut in lysierter (Pferdeblut und mit einer Ausnahme Schafblut) oder defibrinierter (unterschiedlicher Herkunft) Form (CORRY et al., 2003). Die Verwendung von Blut in selektiven Nährmedien gestaltet sich nicht ganz unproblematisch, da nicht immer der gewünschte protektive Effekt erreicht werden kann. Blut wird beispielsweise in selektiven Medien eingesetzt, um die inhibitorische Wirkung der zur Hemmung der Begleitflora eingesetzten Antibiotika gegenüber *Campylobacter* spp. zu neutralisieren. Jedoch läßt sich dieser Effekt durch die Blutzugabe allenfalls mildern, nicht jedoch aufheben. Die protektive Wirkung von Blutzusätzen gegenüber selektiven Agenzien fällt zudem geringer bei *C. coli* als bei *C. jejuni* aus, sodass hieraus niedrigere Nachweisraten für *C. coli* bei ungünstiger Antibiotikakombination resultieren. Je nach Charge des verwendeten Blutes kann seine protektive Wirkung stärker oder schwächer sein und so zu schwankenden oder auch irreführenden Ergebnissen führen. Um diesen Unsicherheitsfaktor zu eliminieren, erscheint die Entwicklung blutfreier selektiver Medien durchaus sinnvoll (NG et al., 1985b).

Im Allgemeinen ist es immer noch üblich, inokulierte Nährmedien zur Detektion von *Campylobacter* spp. unter mikroaerober Atmosphäre zu inkubieren.

Die Rezeptur von flüssigen Nährmedien, die ursprünglich zur Stuhluntersuchung vorgesehen waren, wurden für die Untersuchung von Lebensmitteln teilweise dahingehend modifiziert, dass bereits subletal geschädigte Mikroorganismen, wie sie häufig im Substrat vorzufinden sind, nicht noch zusätzlich durch Inhaltsstoffe des Nährmediums geschädigt werden, sondern möglichst eine Resusztation erfahren. Zur Anzucht von anderen Pathogenen aus Lebensmitteln, wie beispielsweise Salmonellen, wurden flüssige Anreicherungs- und Voranreicherungsmedien entwickelt, um die darin befindlichen vorgeschädigten Keime wiederzubeleben. Entsprechende flüssige Voranreicherungsmedien wurden auch zur Resusztation von *Campylobacter* spp. geschaffen (CORRY et al., 2003).

Als Basismedien zum *Campylobacter*-Nachweis werden in der Regel Formulierungen benutzt, wie sie auch für andere anspruchsvolle Mikroorganismen üblich sind. Diese sind Brucella-Medium, Columbia- oder Blutagarbasis und MÜLLER-HINTON-Bouillon. Es finden aber auch einfachere Substrate wie Nährbouillon Nr. 2 als Grundlage für das PRESTON-Medium Anwendung (BOLTON und ROBERTSON, 1982), weil es wenig Thymidin enthält, das die Wirkung von Trimethoprim, einem häufig angewendeten selektiven Zusatz, hemmt und so der Begleitflora Vorschub gibt. Auch der Zusatz von lysiertem Pferdeblut soll Antagonisten von Trimethoprim einschließlich des Thymidins neutralisieren. Von GOOSSENS et al. (1989) und MARTIN et al. (1983) wurden Nährmedien überprüft, die keinerlei Blut enthalten, dafür jedoch sehr hohe Zusätze von Trimethoprim, wie sie wahrscheinlich nötig sind, um der Hemmung durch Thymidin entgegen zu wirken.

2.6.1.1 Campy-Line-Agar

Das in dieser Arbeit angewendete SimPlate™ *Campylobacter* CI-Verfahren wurde laut Deutschlandvertrieb auf Grundlage des Campy-Line-Agar (CLA) entwickelt (SCHUSTER, 2002b). Dieser wiederum stellt eine Modifikation des Campy-Cefex-Agars dar, der als Oxidationsschutz lediglich lysiertes Pferdeblut und als selektive Komponenten nur Cefoperazon und Cycloheximid enthält. Als Basisnährmedium des CLA dient Brucella-Agar mit einem Zusatz von Hefeextrakt, Eisensulfat, Natriumbisulfit, Natriumpyruvat, α -Ketoglutarat und Natriumcarbonat. Des Weiteren wird der Nährboden mit Hemin und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) supplementiert. Als selektive Agentien kommen Polymyxin B, Trimethoprim, Vancomycin, Cefoperazon, Natriumdesoxycholat und Cycloheximid zum Einsatz.

In einer Studie von fünf selektiven Nährböden zur *Campylobacter*-Detektion wurden u. a. der CLA und der in der aktuell gültigen ISO 10272:2006-Methode zur Detektion von thermophilen *Campylobacter* in Lebensmitteln (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 2006) beschriebene, modifizierte Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCD-Agar) vergleichend überprüft. Untersucht wurden an unterschiedlichen Tagen gewonnene Einstreuproben aus einem Broilermastbetrieb mit und ohne vorherige Anreicherung. Bei weitgehend identischen Nachweisraten von *Campylobacter* spp. hemmte der CLA die Begleitflora am wirkungsvollsten (KIESS et al., 2010). OYARZABAL et al. (2005) untersuchten ebenfalls vergleichend mehrere Nährmedien, wobei auch hier u. a. der CLA und der mCCDA verwendet wurden. Bei dieser Studie, in der Geflügel-Spülwasserproben zur Untersuchung gelangten, erbrachte der CLA, wahrscheinlich aufgrund seiner Fülle an antimikrobiellen Substanzen, die geringsten Nachweisraten. Bei einer Vergleichsuntersuchung von Campy-Cefex-Agar und CLA, bei der unterschiedlich gewonnenes Probenmaterial von Geflügelkarkassen verwendet wurde, lag die Nachweisrate von *Campylobacter* spp. mit CLA im Durchschnitt um 5 % unter der des Campy-Cefex-Agars (LINE und BERRANG, 2005). Dieser Befund erklärt sich durch den höheren Gehalt an Hemmstoffen und somit deutlich bessere Inklusivität, was sich wiederum positiv auf die Unterdrückung der Begleitflora auswirkte. Auch bei der vergleichenden Erhebung von

POTTURI-VENKATA et al. (2007) zeigte CLA niedrigere Nachweisraten als beispielsweise mCCD-Agar und Campy-Cefex-Agar, die ihrerseits sehr ähnliche Ergebnisse lieferten.

Das im CLA enthaltene TTC ist ein farbloser, wasserlöslicher Redoxindikator, der bei Reduktion in das rote Formazan umgewandelt wird. Genutzt wird dieser Effekt zum Nachweis vitaler Zellen bzw. derer Dehydrogenaseaktivität. Bei der Reduktion von TTC handelt es sich nicht um eine speziesspezifische Reaktion, vielmehr sind die unterschiedlichsten Mikroorganismen dazu befähigt (CORRY et al., 2003).

2.6.1.2 ISO 10272:1995

Die ISO 10272:1995 (E) war die erste internationale Normierung eines Nachweisverfahrens zur horizontalen Detektion von thermophilen *Campylobacter* spp. in Lebens- und Futtermitteln (Abb. 1). Bei der Durchführung hat der Untersucher die Möglichkeit, zwischen zwei unterschiedlichen Anreicherungsverfahren zu wählen. Die eine Variante beinhaltet die Anreicherung in PRESTON-Bouillon, die andere die in PARK and SANDERS-Bouillon. Letztere wird empfohlen, wenn vorgeschädigte Mikroorganismen zu erwarten sind.

Die mit Probenmaterial inokulierte PRESTON-Bouillon wird für 18 h bei 42 °C unter mikroaerober Atmosphäre bebrütet. Das Medium enthält neben lysiertem Pferdeblut, welches die Wirkung von Thymidin neutralisiert und vor toxischen Sauerstoffderivaten schützen soll, zur Unterdrückung der Begleitflora eine Kombination aus Cycloheximid, Polymyxin B, Rifampicin und Trimethoprim. Polymyxin ist – wie auch Rifampicin – generell nur wirksam gegen gramnegative Mikroorganismen. Einige *Proteus* spp. verhalten sich allerdings resistent gegenüber Polymyxin (CORRY et al., 2003). Andererseits besteht durch die in PRESTON-Bouillon angewendete Kombination von Rifampicin und Polymyxin B in der angegebenen Konzentration auch die Gefahr einer Hemmung von einigen *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen. Viele bei der *Campylobacter* spp.-Detektion eingesetzte Antibiotika wirken nicht allein, wohl aber in Kombination durchaus hemmend auf thermophile *Campylobacter* spp., insbesondere *C. coli* (NG et al., 1985b). Trimethoprim wird hauptsächlich zur Hemmung von *Proteus* spp. und anderen gramnegativen Bakterien eingesetzt. Zum Unterdrücken von Hefen und Schimmelpilzen wird fast immer Cycloheximid verwendet.

Die Anreicherung in dem Alternativmedium, der PARK and SANDERS-Bouillon, die ebenfalls lysiertes Pferdeblut enthält, geschieht in mehreren Schritten. Nach Inokulation des Mediums erfolgt eine vierstündige Inkubation unter mikroaeroben Bedingungen bei nur 32 °C. Bis dahin enthält die Bouillon zur Hemmung der Begleitflora ausschließlich Vancomycin gegen grampositive Bakterien sowie Trimethoprim gegen *Proteus* spp. und andere gramnegative Begleitkeime. Im Anschluß an diese erste Bebrütungsphase erfolgt eine weitere Inkubation, ebenfalls unter mikroaeroben Bedingungen, jedoch diesmal für die Dauer von zwei Stunden bei 37 °C und nach Zugabe der antibiotischen Lösung B, welche Cefoperazon, mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen grampositive Keime, und Cycloheximid enthält. Der zweiten Inkubationsphase folgt eine dritte ohne weitere Zugaben bei 42 °C unter gleicher Atmosphäre für 40 bis 42 h.

Der gewählten Anreicherungs­methode schließt sich in beiden Fällen die Kultivierung auf zwei festen Nährmedien an, wobei die Verwendung des KARMALI-Agars zwingend vorgegeben ist. Dieser basiert auf Columbia-Agar mit einem Zusatz von Aktivkohle, Hemin, Natriumpyruvat und als selektive Agentien Vancomycin, Cefoperazon sowie Cycloheximid. Als zweiter fester Nährboden stehen modifizierter BUTZLER-Agar, SKIRROW-Agar, Kohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar und PRESTON-Agar, der die gleiche Antibiotika-Kombination wie die PRESTON-Bouillon enthält, zur Auswahl. Unabhängig davon, für welchen zweiten Nährboden man sich entscheidet, findet eine Bebrütung immer unter mikroaeroben Bedingungen bei 42 °C für 24 bis 72 h oder, falls erforderlich, auch bis zu fünf Tage lang statt. Der Kultivierung auf festen Nährböden folgt die Identifizierung und Bestätigung verdächtiger Kolonien mittels mikroskopischer und biochemischer Untersuchung.

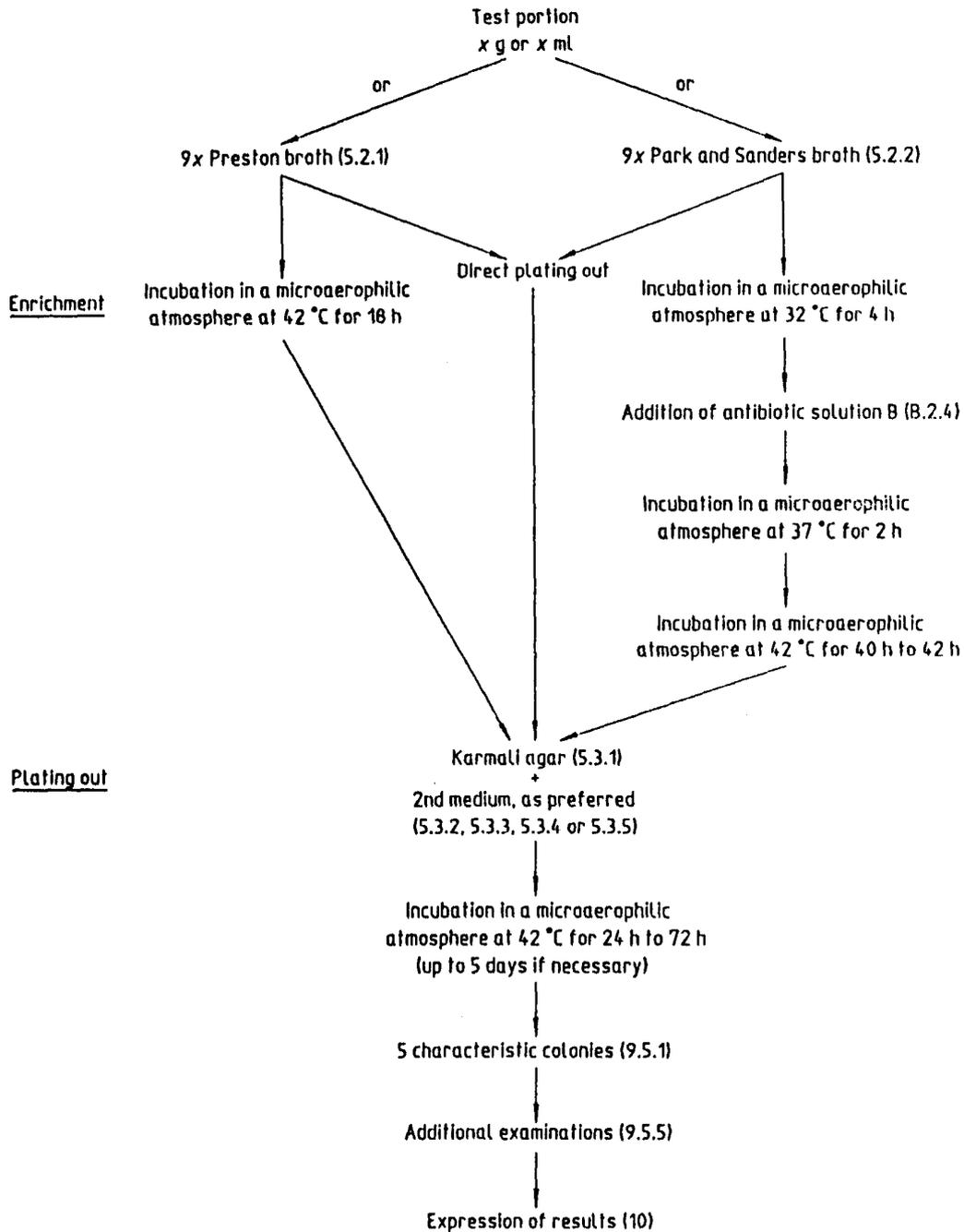


Abb. 1: Flussdiagramm für das Untersuchungsprotokoll nach ISO 10272:1995 (E) der International Standards Organisation Methode zur Detektion von thermophilen *Campylobacter* in Lebensmitteln

In verschiedenen Vergleichsstudien wurden durch den Einsatz der PARK and SANDERS-Anreicherungsbouillon signifikant höhere Nachweisraten von *Campylobacter* spp. ermittelt als bei der Verwendung von PRESTON-Bouillon. Hierbei erbrachte, selbst bei unterschiedlichem Probenmaterial (Gemüse, Geflügelfleisch, Austern), unterschiedlicher vorheriger Behandlung (Tiefkühlung, Kühlung) und auch Probenahmetechniken (Spülproben, destruktive Probennahme), die PARK and SANDERS-Nährbouillon stets mehr positive Ergebnisse als die PRESTON-Bouillon (DE BOER und HUMPHREY, 1991; FEDERIGHI et al., 1999; TANGVATCHARIN et al., 2005). Im Gegensatz dazu erzielten JOSEFSEN et al. (2003) eine deutlich höhere Nachweisrate mit PRESTON-Bouillon als mit PARK and SANDERS-Anreicherungsbouillon. Zwar lieferten beide Untersuchungsprotokolle im qualitativen Nachweis vergleichbare Ergebnisse, jedoch ergaben sich beim semiquantitativen Nachweis unter Verwendung von PRESTON-Bouillon deutlich mehr positive Resultate. In der Studie wurde Spülwasser natürlich kontaminierter Geflügelfleischproben als Untersuchungsmaterial verwendet. Obwohl das Absterben der Mikroorganismen bei der Beimpfung des Mediums bei einer Temperatur von 42 °C (PRESTON-Bouillon), wie in der Studie von DE BOER und HUMPHREY (1991) gezeigt wurde, massiver ausfällt als bei 37 °C (PARK and SANDERS-Anreicherungsbouillon), scheint dieser Effekt bei frischen Geflügelfleischproben offensichtlich weniger ins Gewicht zu fallen, weshalb die Mikroorganismen im Wachstum von den von Beginn an höheren Temperaturen eher profitieren und so die Vermehrungsrate deutlich höher liegt.

Die niedrigere Anfangsbebrütungstemperatur kann jedoch nicht allein Grund für die häufig in Studien festgestellten höheren Nachweisraten bei Anzüchtung im PARK and SANDERS-Anreicherungsmedium sein, da eine Anfangsbebrütung von PRESTON-Bouillon bei 37 °C für vier Stunden mit anschließender Steigerung auf 42 °C keine Steigerung der Nachweisraten erbrachte (SCOTTER et al., 1993). Ein Inokulationsversuch mit *C. jejuni* bestätigte die höhere Sensitivität des PRESTON-Bouillon-Protokolls. Zusätzlich wurden weitere Vorteile dieses Verfahrens herausgestellt. So ist durch die konstante Bebrütungstemperatur und die vor Inokulation und Inkubation erfolgte vollständige Supplementierung des Mediums die Untersuchung mit weniger Arbeitsaufwand und geringerem Kontaminationsrisiko durchführbar. Einen Vorteil bietet auch die kommerzielle Verfügbarkeit als Fertignährmedium (JOSEFSEN et al., 2003).

Campylobacter spp. weisen nach der ISO 10272:1995 (E) die in Tab. 2 aufgeführten Eigenschaften auf, auf deren Basis sich im weiteren Verlauf der Untersuchung die Zugehörigkeit zu dieser Gattung absichern läßt.

Tab. 2: Charakteristika thermophiler *Campylobacter* spp. (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 1995)

| | |
|---------------|----------------------------------|
| Morphologie | kleine gewundene Mikroorganismen |
| Motilität | charakteristisch |
| Gramverhalten | - |
| Oxidase | + |
| Glucose | - |
| Lactose | - |
| Sucrose | - |
| Gasbildung | - |

Zur Speziesdifferenzierung dienen die in Tab. 3 aufgeführten Eigenschaften.

Tab. 3: Eigenschaften zur Speziesdifferenzierung von bei 42,0 °C wachsenden *Campylobacter* spp. (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 1995)

| Charakteristika | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | <i>C. lari</i> | <i>C. upsaliensis</i> |
|---|------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| Wachstum bei 25 °C | - | - | - | - |
| H ₂ S (TSI) | - | (+) | - | - |
| Nalidixinsäure | S | S | R | S |
| Hydrolyse von Hippur- säure | + | - | - | - |
| Katalase | + | + | + | - or slight |
| Cephalothin | R | R | R | S |
| Legende: + = positiv; - = negativ; S = empfindlich; R = resistent | | | | |
| 1) Leichte Bildung von H ₂ S im Kondenswasser nach 5 Tagen | | | | |

2.6.1.3 ISO 10272:2006

Nach mehrfacher Revision der ISO-Methode zum horizontalen Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebens- und Futtermitteln ist die aktuelle Fassung ISO 10272:2006 als Methode L00.00-107 seit 2007 Bestandteil der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des LFGB geworden. Das entsprechende Flussdiagramm findet sich in Abb. 2.

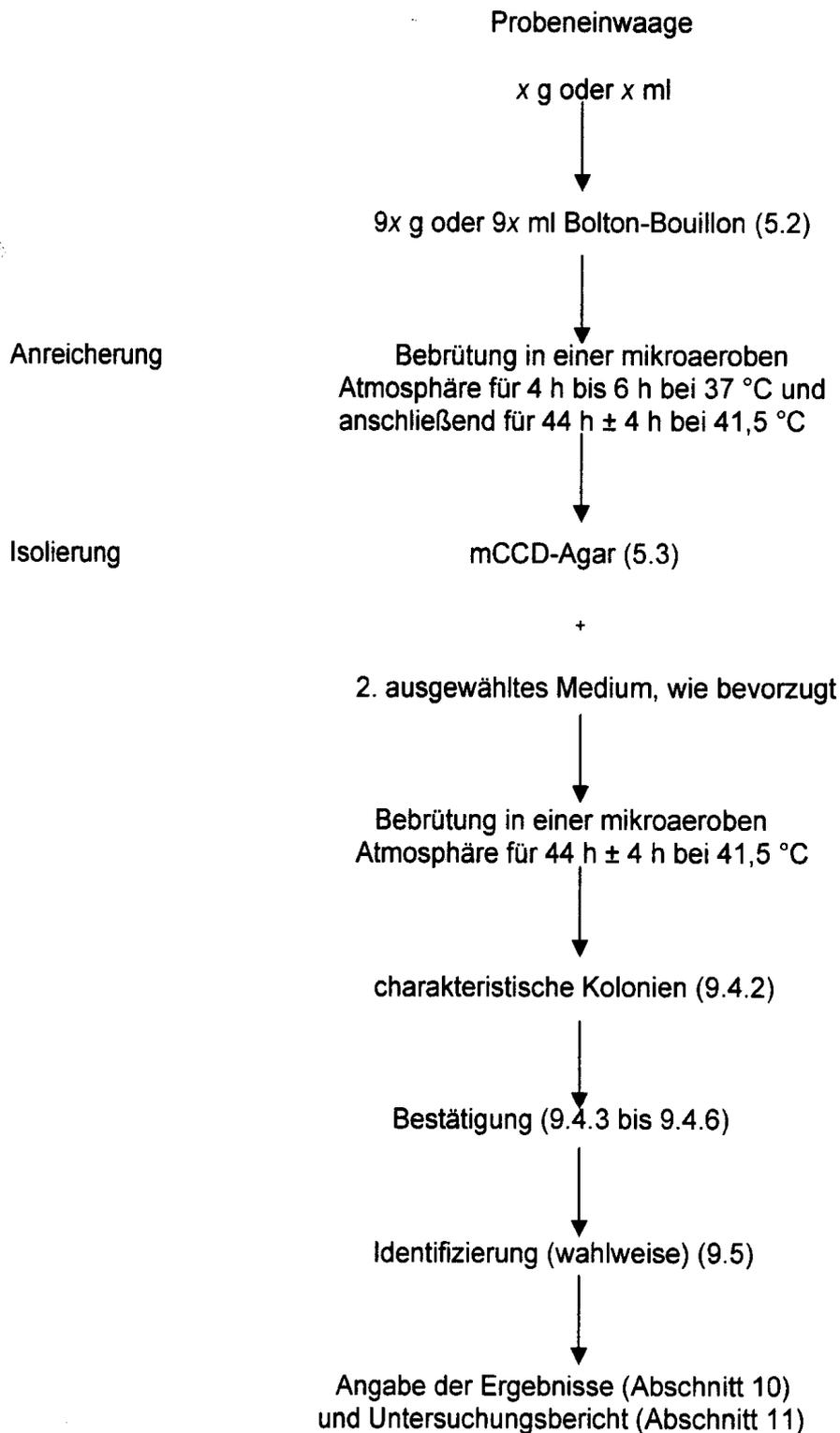


Abb. 2: Flussdiagramm für das Untersuchungsprotokoll nach L00.00-107 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB gemäß der International Standards Organisation Methode zur Detektion von thermophilen *Campylobacter* in Lebensmitteln (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007)

In der deutschen amtlichen Anweisung wurden folgende Abweichungen im Vergleich zur ISO 10272:1995 festgelegt: Grundsätzlich wurde die Bebrütungstemperatur zur Anzucht thermophiler *Campylobacter* von 42,0 °C auf 41,5 °C gesenkt. Als flüssiges Anreicherungsmedium soll ausschließlich BOLTON-Bouillon verwendet werden. Diese wird nach Inokulation zunächst unter mikroaerober Atmosphäre bei 37 °C für vier bis sechs Stunden bebrütet. Anschließend wird die Temperatur auf 41,5 °C angehoben, und es folgt eine weitere Inkubation von 44 ± 4 h. Wie auch schon in der Methode von 1995 festgelegt, werden nach Voranreicherung zwei feste Nährböden beimpft. Verpflichtend ist dabei die Verwendung des Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agars (mCCD-Agar) in Kombination mit einem frei wählbaren Nährboden, für den lediglich präzisiert wird, dass er auf einem anderen Prinzip als dem des mCCD-Agars basieren muss. Zur Untersuchung der Morphologie, Motilität, des mikroaeroben Wachstums bei 25 °C, des aeroben Wachstums bei 41,5°C und der Oxidaseaktivität werden bis zu fünf verdächtige Kolonien von den beiden Selektivnährböden ausgewählt und Reinkulturen auf Columbia-Agar angelegt. In der Version von 1995 wurden grundsätzlich fünf verdächtige Kolonien untersucht. Die Überprüfung von Morphologie und Motilität erfolgte in der alten Fassung unter Verwendung von Koloniematerial der Selektivnährböden. Aerobes Wachstum bei 41,5 °C wurde gar nicht getestet. Neu hinzugekommen ist auch der Nachweis der Indoxylacetathydrolyse, die bei *C. jejuni*, *C. coli* sowie *C. upsaliensis* positiv und bei *C. lari* negativ ausfällt.

Campylobacter spp. weisen laut ISO 1072:2006 die in Tab. 4 angeführten Eigenschaften auf und werden anhand dieser Kriterien identifiziert.

Tab. 4: Eigenschaften von *Campylobacter* spp., die gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-107 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007) überprüft werden

| | |
|---------------------------------|---------------------------|
| Morphologie | kleine gekrümmte Stäbchen |
| Motilität | charakteristisch |
| Mikroaerobes Wachstum bei 25 °C | - |
| Aerobes Wachstum bei 41,5 °C | - |
| Oxidase | + |

Zur Speziesdifferenzierung der bei 41,5 °C wachsenden *Campylobacter* spp. dienen die in Tab. 5 aufgeführten Eigenschaften.

Tab. 5: Differenzialdiagnostisch verwendete Eigenschaften von *Campylobacter* spp. gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-107 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2007)

| Eigenschaften | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | <i>C. lari</i> | <i>C. upsaliensis</i> |
|---|------------------|----------------|------------------|-----------------------|
| Katalase | + | + | + | - oder gering |
| Nalidixinsäure | S ^a | S ^a | R/S ^b | S |
| Cephalothin | R | R | R | S |
| Hydrolyse von Hippurat | + | - | - | - |
| Indoxylacetat | + | + | - | + |
| Legende: + = positiv; - = negativ; S = empfindlich; R = resistent | | | | |
| ^a Es wurde eine Zunahme der Resistenz bestimmter Stämme von <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i> gegenüber Nalidixinsäure nachgewiesen. | | | | |
| ^b Es existieren sowohl empfindliche als auch resistente Stämme von <i>C. lari</i> . | | | | |

2.6.2 Molekularbiologischer Nachweis und Speziesdifferenzierung

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wird DNS oder cDNS *in vitro* vervielfältigt. Zunächst wird der zu untersuchende Mikroorganismus in einem entsprechenden Nährmedium angereichert, wobei zu beachten ist, dass nicht nur optimale Wachstumsbedingungen für den Keim geschaffen werden, sondern die verwendeten Komponenten auch einen störungsfreien Ablauf der PCR zulassen. So können Bestandteile wie Blut, Kohle oder auch Hämoglobin, mithin Stoffe, die häufig bei der Anreicherung von *Campylobacter* spp. Anwendung finden, den erfolgreichen Ablauf einer PCR hemmen (NG et al., 1997; ROSSEN et al., 1992).

LICK et al. (2007) verglichen eine Auswahl bereits publizierter und gebräuchlicher sowohl konventioneller als auch Real-Time-PCR-Methoden bezüglich ihrer Spezifität miteinander. Zur Untersuchung wurden 65 *Campylobacter*-Stämme (darunter 18 Stämme von *C. jejuni*, 8 Stämme von *C. coli* und 14 Stämme von *C. lari*) herangezogen. Parallel dazu fand ein kultureller Nachweis statt. Die Auswertung ergab für alle Methoden eine sehr gute Spezifität von 96-100 %. Die Selektivität dagegen zeigte einige Unsicherheiten. So wurden eng verwandte Spezies teilweise miterfasst. Aufgrund der vorliegenden großen Variabilität in der Sequenz vieler zur PCR-Analyse herangezogenen Zielgene, die aus der hohen Intraspezies-Rekombinationrate resultiert, wird von den Autoren empfohlen, für den Nachweis durch die

PCR-Methode generell zwei Analysen mit verschiedenen Zielgenen parallel durchzuführen. Wichtig ist es, bei jeder Untersuchung grundsätzlich eine Amplifikationskontrolle mitzuführen, weil dadurch falsch-negative Ergebnisse erkannt werden, die z. B. durch o. g. Hemmmechanismen, aber auch durch Inaktivität der angewendeten Polymerase auftreten können.

Bei der PCR-Analyse besteht in der Regel nicht die Möglichkeit nachzuweisen, ob es sich bei den erfassten Mikroorganismen um lebende Zellen handelt. Vielmehr kann sogar der Nachweis von Erbmateriale aus Keimen erfolgen, die bereits vor Wochen abgetötet worden sind. Dagegen vermag die Reverse-Transkriptase-PCR lebensfähige von nicht-lebensfähigen Zellen zu unterscheiden (SCHEU et al., 1998).

2.6.3 Immunologische Nachweisverfahren

Unter immunologischen Nachweisverfahren versteht man Methoden, die einen Analyten in einer flüssigen Phase durch eine Antikörper-Antigen-Bindung erfassen. Sie gehören zu den sogenannten Immunoassays. Hierbei macht man sich die meist hohe Spezifität und Stärke einer solchen Bindung zunutze.

Das zu analysierende Material wird, wenn es nicht bereits in flüssiger Form vorliegt, meist in einer Pufferlösung gelöst. Partikuläre Strukturen, beispielsweise Mikroorganismen, können, sofern sie antigene Strukturen an ihrer Oberfläche tragen, als Suspension vorliegen.

Bei dem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um eine Technik, die auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die verwendeten Enzyme katalysieren eine Reaktion, bei der entweder aus dem chromogenen Substrat eine bestimmte Farbe entsteht oder eine Lichtabgabe durch Chemilumineszenz ausgelöst wird. Sowohl die Farb- als auch die Lichtintensität können mit entsprechenden Geräten gemessen und ausgewertet werden. Hierzu wird allerdings die vorherige Erstellung einer Kalibrierungskurve mit Hilfe von Lösungen/Suspensionen des Zielmaterials mit bekannter Konzentration benötigt.

Die verschiedenen Immunoassay-Formate unterscheiden sich prinzipiell nur in der Art der Markierung des Detektionsreagenzes. Neben den häufig verwendeten Enzymmarkierungen beim ELISA besteht auch die Möglichkeit zur Verwendung von schwachradioaktiven Substanzen als Marker bei den sogenannten Radioimmunassays (RIA). Auch die Bindung des Detektionsreagenzes an Goldkolloide oder farbige Polymerpartikel ist möglich. Hier reicht die makroskopische Betrachtung zur Auswertung der Platten ohne die Notwendigkeit weiterer Gerätschaften aus. Neben diesen Varianten gibt es noch die relativ seltenen Assays, bei denen zur Markierung magnetische Partikel verwendet werden und die zur Auswertung eine Messung der Magnetfeldstärke erfordern. Auch elektrochemische Verfahren auf der Basis von Impedanzmessungen wurden bereits entwickelt.

Mit dem gelösten oder auch suspendierten Untersuchungsmaterial werden bei modernen Techniken die Kavitäten eigens dafür entwickelter Mikrotiterplatten bestückt. In diesen Vertiefungen gebunden befinden sich die passenden Antikörper oder Antigene. Einfachere Ausführungen für einen kleinen Probendurchsatz sind z. B. der Immunblot oder der Lateral

Flow Assay, bei dem an eine Membran gebundene Primärantikörper verwendet werden (LUTTMANN et al., 2009; DAVIS, 2005).

2.6.4 Schnelltests und alternative Nachweisverfahren

Wegen der großen Relevanz von *Campylobacter* spp. als enteropathogener Keim ist es zur Risikoeinschätzung und Entwicklung von Lebensmittelsicherheitsrichtlinien sinnvoll, Systeme zum schnellen und sicheren Nachweis zu entwickeln. Mittlerweile wurde eine Vielzahl solcher auf verschiedenen Grundlagen basierenden Verfahren auf den Markt gebracht. Dabei werden meist unterschiedliche Ziele verfolgt, z. B. einfache Handhabung, geringer Laboraufwand, schnell verfügbare Ergebnisse, Bearbeitung großer oder auch nur kleiner Probenvolumina. Häufig ist eine z. T. aufwendige und kostspielige Apparatur nötig, was den Einsatz in kleineren Institutionen stark begrenzt.

Bei den meisten Schnelltests und alternativen Nachweisverfahren handelt es sich um Kombinationen unterschiedlicher Methoden, z. B. molekularbiologischer und immunologischer Techniken, wobei gelegentlich auch eine Voranreicherung in einem Kulturmedium vorgeschaltet sein kann. Reine biochemische Schnelltests sind eher selten und stellen in der Regel ein miniaturisiertes biochemisches Assay dar. Zwei auf diesem Prinzip basierende im Handel erhältliche Testkits sind das API® Campy der Firma bioMérieux und das SimPlate™ Campylobacter CI-System der Firma BioControl Systems, Inc.

Ein aktuelles Beispiel für die Kombination zweier unterschiedlicher Untersuchungsmethoden stellt die von KAWATSU et al. (2010) erfolgreich getestete Technik dar. Die Autoren kombinierten eine zweistufige Voranreicherung mit einer anschließenden Untersuchung mittels eines im Handel erhältlichen immunochromatographischen Assays, dem NH Immunochromato Campylobacter (NH IC Campy, Nippon Meat Packers, Ibaraki, Japan). Mit diesem Testkit ist es möglich, *Campylobacter*-Antigene in einer Anreicherungsbouillon innerhalb von 15 min zu erfassen. Insgesamt dauert der Nachweis inklusive der Voranreicherung 48 h. Als Probenmaterial wurde natürlich kontaminiertes Geflügelfleisch verwendet.

2.6.4.1 SimPlate™ Campylobacter CI-System

Bei dem SimPlate™ Campylobacter CI-System handelt es sich um eine modifizierte kulturelle Nachweismethode. Es ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung thermophiler *Campylobacter*, wobei der Hersteller die Spezies, für welche die Validierung stattgefunden hat, nicht näher benennt. Das im Handel erhältliche Testkit bedient sich einerseits eines Redoxfarbstoffes zur Auswertung, der auch in dem bereits beschriebenen Campy-Line-Agar zum selben Zweck verwendet wird, und ist andererseits für die quantitative Bestimmung an die ISO-MPN-Methode angelehnt. Eine speziell hierfür entwickelte Platte mit einer definierten Anzahl an Kavitäten, die dem multiplen Ansatz der Probe im ISO-MPN-Verfahren in miniaturisierter Form folgt, wird mit einer Mischung aus flüssigem Nährmedium und 1/10 Erstverdünnung beschickt. Für die Mischung muss eine eigens für dieses System entwickelte, frisch angesetzte Nährlösung verwendet werden.

Zunächst wird das trockene Fertignährmedium in 9 ml deionisiertem Wasser oder Butterfields Phosphatpuffer gelöst und zur Vervollständigung mit separat hergestelltem Rifampicin- und Hemin-Additiv supplementiert. Zum Nachweis von *Campylobacter* spp. werden 9 ml des so zubereiteten Nährmediums mit bis zu 1 ml einer 1/10 Verdünnung des Probenmaterials inokuliert (BIOCONTROL, 2002). Zur Herstellung der Erstverdünnung des Probenmaterials soll laut Firmenangabe Butterfields Phosphatpuffer verwendet werden, allerdings ist nach Anfrage beim deutschen Vertreter CORING SYSTEM Diagnostix GmbH auch die Verwendung von gepuffertem Peptonwasser möglich (SCHUSTER, 2002b). Über die genauen Inhaltsstoffe des Nährmediums wird aufgrund der Patentierung durch die Herstellungsfirma keine Auskunft gegeben. Lediglich die Verwendung von Rifampicin als selektivem Agens, Hemin als protektiver Substanz gegenüber toxischen Sauerstoffderivaten und Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als Indikator ist bekannt (SCHUSTER, 2002a).

Eine Vergleichsuntersuchung von ISO-Methode, SimPlate™ *Campylobacter* CI-System und der Schnellnachweismethode Singlepath® der Firma Merck ergab zwar eine hohe Korrelation des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems mit der ISO-Methode als ISO-MPN-Verfahren, jedoch nur, wenn die empfohlene Inkubationszeit von 48 h auf bis zu 5 Tage ausgedehnt wurde. Andernfalls traten zu oft falsch-negative Ergebnisse auf (HAZELEGER et al., 2005). In einer jüngeren Untersuchung lieferte das SimPlate™ *Campylobacter* CI-Verfahren dem angewandten traditionellen Verfahren gegenüber vergleichbare Ergebnisse. Allerdings beschränkte man sich auf einen Presence/Absence-Nachweis ohne Betrachtung der Quantität (REITER et al., 2010).

2.6.4.2 Sonstige Nachweisverfahren: Singlepath®, miniVIDAS® und andere

Es gibt viele weitere Beispiele für alternative Nachweismethoden, die meist zum Zwecke der Zeitersparnis, der Minderung des Laboraufwandes und/oder der Reduzierung von Kosten entwickelt wurden.

Mit dem Singlepath® *Campylobacter* Lateral Flow Assay brachte die Firma Merck ein qualitatives immunochromatographisches System zum Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* auf den Markt. Dabei werden hochspezifische, mit Gold markierte Antikörper eingesetzt. Diese verbinden sich beim Vorliegen von *C. jejuni* bzw. *C. coli* mit den entsprechenden Antigenen und fließen über eine mit spezifischen Fangantikörpern besetzte Membran. Bei einem positiven Ergebnis kommt es zur Komplexbildung und einer dadurch initiierten sichtbaren Farbbildung. Der eigentlichen Nachweisreaktion wird ein insgesamt 48-stündiger kultureller Anreicherungsschritt in BOLTON-Nährbouillon bei zwei Temperaturstufen vorgeschaltet. 1 bis 2 ml der Anreicherung werden anschließend für 15 min gekocht und dabei eventuell entstandenes Sediment vor der Beschickung des Testfeldes resuspendiert. Das Ergebnis kann dann nach 20 min abgelesen werden. Das System besitzt eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber *C. jejuni* als gegenüber *C. coli*, da selbst bei einer Kontamination mit *C. coli* von $4,0 \times 10^5$ KBE/ml ein negatives Ergebnis angezeigt wurde. Dagegen konnte die Anwesenheit von *C. jejuni* bis zu einer Konzentration von 10^3 KBE/ml nachgewiesen werden (JELINEK et al., 2005). Bei der Verwendung von Reinkulturen wurde eine dem ISO-Verfahren vergleichbare Sensitivität und Spezifität festgestellt. Das

Singlepath®-Verfahren wird zur Routineuntersuchung von Lebensmittelproben als geeignet angesehen und erzielte bei vergleichenden Studien mit dem miniVIDAS® System der Firma bioMérieux übereinstimmende Ergebnisse (BUBERT et al., 2004). Die Kosten und der Laboraufwand bei diesem Test sind gering. Allerdings ist die Sensitivität nicht besonders hoch.

Eine weitere Methode, das miniVIDAS® System der Firma bioMérieux, zeigt eine dem klassischen kulturellen Verfahren teilweise überlegene Sensitivität. Auch bei diesem System handelt es sich um eine immunologische Nachweistechnik. Es werden *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* ebenfalls nach einem Anreicherungsschritt innerhalb von ca. 48 h detektiert (REITER et al., 2010). Allerdings ist das Verfahren größtenteils automatisiert, was für das untersuchende Labor eine entsprechende finanzielle Investition bedeutet.

Einen Überblick über die derzeit validierten alternativen Nachweismethoden von Mikroorganismen in Lebensmitteln gibt das Review von JASSON et al. (2010). In Tab. 6 sind einige zurzeit verfügbare Identifizierungsmethoden für *Campylobacter* spp. aus der Fülle aller Detektionsverfahren, deren Detektionsgrundlage ein biochemisches oder ein Immunoassay bildet, aufgrund dieser Publikation und der Herstellerangaben aufgelistet. Die validierten Methoden sind durch Hochzahlen entsprechend hervorgehoben.

Tab. 6: Auflistung ausgewählter Detektionsverfahren zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

| Detektionsgrundlage | Handelsbezeichnung | Hersteller | Zeitaufwand | <i>Campylobacter</i> spp. | Prinzip |
|----------------------------|---|----------------------------------|--|---|---|
| Immunoassay | Alert® for <i>Campylobacter</i> | Neogen Corporation | keine Angaben | keine Angaben | ELISA |
| | VIDAS CAM | bioMérieux Vitek | 48 h | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> | Sandwich-ELISA (zwei Antikörper) |
| | EIAFoss <i>Campylobacter</i> | Foss North America, Inc. | 48 h | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> | automatisiertes ELISA mit immunomagnetischer Trennung |
| | mini-VIDAS | bioMérieux Vitek | 48 h | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> | Sandwich-ELISA (zwei Antikörper) |
| | <i>Campylobacter</i> VIA | TECTRA® | 42 h davon 2 h zur Detektion nach Anreicherung | <i>Campylobacter</i> spp. | Immunoassay |
| | Pathatrix | Matrix Microscience Inc. | 21 h | <i>Campylobacter</i> spp. | mit Antikörpern beschichtete paramagnetische Partikel |
| | Singlepath® ¹ | Merck KgaA / EMD Chemicals, Inc. | 48 h Anreicherung; 35 min zur Detektion | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> | immunochromatographisches Lateral Flow Assay |
| | Transia® Plate <i>Campylobacter</i> | Diffchamb AB | 46 h | <i>Campylobacter</i> spp. | ELISA |
| Immuno-Latex-Agglutination | Microgen™ <i>Campylobacter</i> | Microgen Bioproducts | Objekträgeragglutination | <i>C. jejuni</i> <i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> <i>C. upsaliensis</i> <i>C. fetus</i> | Latex-Agglutination |
| | Dryspot <i>Campylobacter</i> test kit | Oxoid | keine Angaben | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> <i>C. upsaliensis</i> | Latex-Agglutination |
| | Slidex | bioMérieux | 15 min nach Kultivierung | <i>Campylobacter</i> spp. | Latex-Agglutination |
| Biochemie | API Campy | bioMérieux | 24 h | keine Angaben | miniaturisiertes biochemisches Assay |
| | SimPlate <i>Campylobacter</i> CI - System | BioControl Systems, Inc. | 48 h | keine Angaben | miniaturisiertes biochemisches Assay |

¹ AOAC Research Institute *Performance Tested Method*SM (PTM) nur für *C. jejuni* und *C. coli*

2.6.5 Differenzierung der *Campylobacter* spp. und Typisierung

2.6.5.1 Biochemische bzw. Biotypisierung

Nach der nunmehr geltenden ISO 10272-1:2006 (E) (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 2006), die als Grundlage für die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB L 00.00-107 dient, werden die in Tab. 5 aufgeführten Eigenschaften von *Campylobacter* spp. zur Speziesdifferenzierung herangezogen.

Im Gegensatz dazu wurden in der ISO 10272:1995 (E) (INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO), 1995) *C. jejuni* und *C. coli* noch als ausnahmslos sensitiv bzw. *C. lari* als ausnahmslos resistent gegenüber Nalidixinsäure beschrieben. Außerdem wurde dort auch noch die nach fünf Tagen nachweisbare geringe Schwefelwasserstoffbildung im Kondenswasser durch *C. coli* als Differenzierungskriterium herangezogen.

Alle von STEELE et al. (1985) überprüften Stämme von *C. coli*, *C. lari* und *C. jejuni* erwiesen sich bezüglich der Nitratreduktion als positiv, außer neun von zwölf getesteten als atypisch bezeichneten *C. jejuni*-Isolaten. Die Autoren hoben hervor, dass die konventionelle Speziesidentifizierung von *Campylobacter* aufgrund von biochemischen Kriterien in den meisten klinischen Laboratorien problematisch ist, weil diese Gattung nur geringe biochemische Aktivitäten zeigt und somit auch nur auf wenige Parameter überprüft werden kann. Außerdem erbrachte die Studie, dass es auch innerhalb einer Spezies durchaus atypische Stämme mit abweichenden biochemischen Reaktionen gibt, welche dann zu einer falschen Zuordnung führen können. Einige Stämme ließen sich durch DNS-Untersuchungen eindeutig identifizieren, eine allein auf den biochemischen Leistungen basierende Spezieszuordnung war nicht möglich.

Eine Stammtypisierung gelingt durch die Biotypisierung bei *Campylobacter* spp. nur in einem Fall und zwar kann bei *C. lari* zwischen einem Urease-positiven (Urease-positive thermophile *Campylobacter*: UPTC) und -negativen Stamm unterschieden werden (MATSUDA und MOORE, 2004)

Eine etwas umfangreichere tabellarische Darstellung zur Speziesdifferenzierung humanpathogener thermophiler *Campylobacter* spp. gibt Tab. 7 (CORY et al., 2003).

Tab. 7: Diagnosemerkmale zur Differenzierung von humanpathogenen *Campylobacter* spp. nach CORRY et al. (2003)

| | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | <i>C. fetus</i> | <i>C. lari</i> | <i>C. upsaliensis</i> | <i>C. hyointestinalis</i> | <i>Arcobacter</i> spp. |
|---|-------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|
| | <i>ssp. jejuni ssp. doley</i> | | | | | | |
| aerobes Wachstum bei 30 °C oder 36 °C | - | - | - | - | - | - | + |
| mikroaerobes Wachstum bei 25 °C | - | + | - | D | + | | |
| 37°C | + | + | + | + | D | | |
| 42°C | + | W | D | D | D | | |
| Katalase | + | D | + | + | W oder + | | |
| Oxidase | + | + | + | + | + | | |
| Nitratreduktion | + | - | + | + | + | | + oder - |
| Cephalothin 30 µg | R | S | R | S | S | | R/S |
| Nalidixinsäure 30 µg | S | S | R | S | R | | S |
| H ₂ S-Bildung in TSI | - | W | - | - | + | | - |
| Hydrolyse von Indoxylacetat | + | + | - | + | - | | +W |
| Hydrolyse von Hippurat | + | - | - | - | - | | - |
| Hydrolyse von Harnstoff | - | - | -/+ | - | - | | -/+ |
| Wachstum bei Anwesenheit von 1 % Glycin | + | + | + | + | + | | +/- |
| Wachstum auf MacConkey Agar | + | ? | + | + | + | | D/+ |
| Wachstum auf Campy-BAP Agar (BBL) | + | ? | + | ? | ? | | - |
| Wachstum auf Campy-CVA ohne Polymyxin | + | ? | + | ? | ? | | + |

V = 50 % positiv; W = negativ oder schwach positiv; D = einige positiv, einige negativ; R = resistent; S = sensitiv; TSI = Dreizucker-Eisen-Agar

2.6.5.2 Molekularbiologische Typisierung

Gerade epidemiologische Studien verlangen die Bearbeitung von großen Probenzahlen in kürzester Zeit mit geringstmöglichem Aufwand. Hierfür bietet sich ein DNS-Nachweis von *Campylobacter* spp. geradezu an. Dieser beinhaltet in der Regel neben der Identifizierung der Art auch eine Differenzierung innerhalb der Spezies. Hierfür ist eine Fülle von Untersuchungsprotokollen für PCR und Real-time-PCR kommerziell erhältlich. Ergebnisse sind meist innerhalb von wenigen Stunden zu erwarten.

Zur Stammtypisierung stehen vielfältige Methoden zur Verfügung. Dabei sind die Biotypisierung, d. h. die Unterscheidung aufgrund biochemischer Leistungen bei *Campylobacter* spp. nur im Ausnahmefall (s. Harnstoffspaltung durch *C. lari*) möglich. Nicht mehr gebräuchlich sind die Sero- und Phagotypisierung. Im Allgemeinen wird zur Differenzierung eine Methode aus dem Bereich der Genotypisierung angewendet. Hierzu gehören beispielsweise die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), die Ribotypisierung, der Amplifizierte Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP) und die Multilocus-Sequenz-Typisierung (MLST) (ALTER, 2011).

Bei der PFGE handelt es sich um die konventionelle Gelelektrophorese, wobei die chromosomale DNS von entsprechenden Restriktionsenzymen in verschieden große Fragmente geschnitten wird. Diese Abschnitte werden in einem gepulsten elektrischen Feld aufgetrennt. Ihre unterschiedliche Größe läßt die DNS-Fragmente verschieden schnell auf dem Trägergel im elektrischen Feld wandern. Dadurch stehen spezifische DNS-Banden für die Auswertung zur Verfügung (INDRA, 2006; WICHELHAUS et al., 2000).

Bei der Ribotypisierung werden spezifische chemilumineszente oder enzymmarkierte DNS-Sonden eingesetzt, welche DNS identifizieren, die ihrerseits ribosomale RNS kodiert. Die zuvor durch eine PFGE aufgetrennten DNS-Fragmente werden auf eine Nitrocellulose-Membran (Southernblot) übertragen. Die Sonden binden dann an für sie spezifische DNS-Abschnitte und zeigen diese dadurch an. (WICHELHAUS et al., 2000).

Beim AFLP werden DNS-Fragmente an eine Adaptornukleinsäure gebunden, an die sich ein Primer heftet, der dann die Vermehrung des entsprechend markierten Segments vermittelt. Anschließend erfolgt wieder die Trennung der Fragmente durch eine PFGE (WICHELHAUS et al., 2000).

Für die MLST werden Fragmente mit einer Größe von ca. 600 Basenpaaren, die von Genen aus dem konservierten Kerngenom stammen, ausgewählt und sequenziert (WIEHLMANN et al., 2007).

Einen Überblick über die verschiedenen üblicherweise angewandten molekularen Techniken gibt WASSENAAR (2000). In Tab. 8 sind einige zurzeit verfügbare Typisierungsmethoden für *Campylobacter* spp. aus der Fülle der stetig steigenden Anzahl molekularbiologischer Verfahren unter Rückgriff auf das Review von JASSON et al. (2010) und die Herstellerangaben aufgelistet. Die validierten Methoden sind durch Hochzahlen entsprechend hervorgehoben.

Allerdings liefern molekularbiologische Verfahren kein mikrobiologisches Material zur Anzucht oder für weiterführende Untersuchungen.

Tab. 8: Auflistung ausgewählter molekularbiologischer Typisierungsverfahren zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

| Detektions- grundlage | Handelsbezeichnung | Hersteller | Zeitaufwand | <i>Campylo- bacter</i> spp. |
|--------------------------|--|--------------------------|---|--|
| DNS | ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for <i>Campylobacter</i> Quantification | AES Chemunex | 21 h für Anreicherung und Detektion | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> |
| | BAX® System ^{1,2} | DuPont Qualicon | 24 h bei Anreicherung; 90 min Detektion | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> |
| | GENE-TRAK <i>Campylobacter</i> Assay | GENE TRAK | 50 h | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> |
| | AccuProbe® <i>Campylobacter</i> Culture Identification Test | GenProbe® | 30 min Detektion; nach Anzucht auf Nährboden | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. lari</i> |
| | Probelia™ PCR-System | BioControl Systems, Inc. | 24 h | <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i> |

¹ Validierungszertifikat: NordVal

² AOAC Research Institute *Performance Tested Method*SM (PTM)

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsplanung und Vorversuche

Die vorliegende Arbeit stellt die Aussagekraft des Schnellverfahrens der Firma BioControl zur Bestimmung und Quantifizierung von thermophilen *Campylobacter*-Keimen, SimPlate™ *Campylobacter* CI, dem Referenzverfahren der ISO 10272:1995 (E) im ISO-MPN-Verfahren gegenüber.

Um die Ergebnisse vergleichen zu können, musste für beide Untersuchungsmethoden identisch kontaminiertes Substrat zur Verfügung stehen. Damit diese Vorgabe bei dem natürlich kontaminierten Probenmaterial gewährleistet war, wurden zwei unterschiedliche Varianten der Bereitstellung angewendet. Gemein haben beide, dass die Ausgangsmaterialien für die zwei Nachweisverfahren zunächst zusammen bearbeitet und homogenisiert wurden.

Insgesamt 116 Puten- und Hähnchenfleischproben (Vor- und Hauptversuche) aus dem Berliner Einzelhandel wurden im Zeitraum von Oktober 2003 bis August 2005 eingekauft und untersucht. Dabei wurde sowohl fertig verpackte Ware aus dem SB-Bereich als auch lose verkaufte Ware aus der Frischfleischtheke einbezogen.

Als Positivkontrollen wurden bei jedem Versuch sowohl ein *C. coli*- als auch ein *C. jejuni*-Stamm der DSMZ mitgeführt.

16 Probenansätze erfolgten im Rahmen von Vorversuchen. Hierbei wurden ebenfalls Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Die Probenaufbereitung fand nach Verfahren A statt (s. 3.8.1). Alle positiven Ergebnisse der Hauptversuche wurden durch Untersuchung von Koloniematerial der Selektivnährböden mittels eines PCR-Verfahrens bestätigt. Eine durch die ISO 10272:1995 (E)-Methode als falsch-negativ identifizierte SimPlate™ *Campylobacter* CI-System-Platte wurde probeweise für 96 h bebrütet (s. Tab. 17).

3.2 Material zum Nachweis von *Campylobacter* spp. entsprechend ISO 10272:1995 (E)

3.2.1 Flüssige Nährmedien

PRESTON-Selektiv-Anreicherungsbouillon

Nährbouillon Nr. 2 (Oxoid CM 67):

Zusammensetzung/l:

Fleischextrakt „Lab-Lemco“

10,0 g

Pepton

10,0 g

| | |
|--|----------|
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| pH-Wert: 7,5 ± 0,2 | |
| 12,5 g in 475 ml Aqua dest. lösen | |
| Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten | |
| Abkühlung auf 50 °C | |
| 25 ml <i>lysiertes Pferdeblut (Oxoid, Art.-Nr. SR0048)</i> /475 ml | |
| <i>Campylobacter-Selektiv-Supplement (PRESTON) (Oxoid, Art.-Nr. SR 117)</i> | |
| Zusammensetzung/l Nährbouillon: 2 Fiolen/l: | |
| Cycloheximid | 100,0 mg |
| Polymyxin B | 5000 IE |
| Rifampicin | 10,0 mg |
| Trimethoprim | 10,0 mg |
| aseptisch zu lösen in 2 ml (1:1) Aqua dest./ Aceton pro Fiole | |
| <i>Campylobacter-Anreicherungs-Supplement (Oxoid, Art.-Nr. SR 84)</i> | |
| Zusammensetzung/l Nährbouillon: 2 Fiolen/l: | |
| Natriumpyruvat | 125,0 mg |
| Natriumdisulfit | 125,0 mg |
| Eisen(II)-sulfat | 125,0 mg |
| aseptisch zu lösen in 2 ml sterilem Aqua dest. pro Fiole | |

Brucella Bouillon

BBL™ Brucella Broth (Becton, Dickinson and Company, REF 211088):

Zusammensetzung/l:

| | |
|---|--------|
| Tiergewebe | 10,0 g |
| Glucose | 1,0 g |
| Hefeextrakt | 2,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| Natriumbisulfit | 0,1 g |
| pH-Wert: 7,0 ± 0,2 | |
| 28,0 g in 1,0 l Aqua dest. lösen | |
| Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten | |

3.2.2 Feste Nährmedien

KARMALI-Agar

Campylobacter-Agar-Basis nach KARMALI, blutfrei (Oxoid, Art.-Nr. CM 935B):

Zusammensetzung/l:

| | |
|--|-----------|
| Columbia-Agar-Basis | 39,0 g/l |
| Aktivkohle | 4,0 g/l |
| Hemin | 16,0 mg/l |
| pH-Wert: 7,4 ± 0,2 | |
| 21,5 g in 500 ml Aqua dest. lösen | |
| Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten | |
| Abkühlung auf 50 °C | |
| <i>Campylobacter-Selektiv-Supplement KARMALI (Oxoid, Art.-Nr. SR 167)</i> | |
| Zusammensetzung/l Nährboden: 2 Fiolen: | |
| Cefoperazon | 32,0 mg |
| Cycloheximid | 100,0 mg |
| Vancomycin | 20,0 mg |
| Natriumpyruvat | 100,0 mg |
| aseptisch zu lösen in 2 ml (1:1) Aqua dest./ Ethanol pro Fiole | |

PRESTON-Agar

Campylobacter-Agar-Basis (Oxoid, Art.-Nr. CM0689):

Zusammensetzung/l:

| | |
|----------------------------|--------|
| Fleischextrakt „Lab-Lemco“ | 10,0 g |
|----------------------------|--------|

| | |
|----------------|--------|
| Pepton | 10,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| Agar | 12,0 g |

pH-Wert: $7,5 \pm 0,2$

18,5 g in 475 ml Aqua dest. lösen

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

Abkühlung auf 50 °C

Campylobacter-Selektiv-Supplement nach PRESTON (Oxoid, Art.-Nr. SR 117)

Zusammensetzung/l Nährboden: 2 Fiolen/l

| | |
|--------------|----------|
| Cycloheximid | 100,0 mg |
| Polymyxin B | 5000 IE |
| Rifampicin | 10,0 mg |
| Trimethoprim | 10,0 mg |

aseptisch zu lösen in 2 ml (1:1) Aqua dest./Aceton pro Firole

25 ml **lysiertes Pferdeblut (Oxoid, Art.-Nr. SR00 48)**/475 ml

Columbia-Agar mit Schafblut

Columbia-Agar-Basis (Oxoid, Art.-Nr. CM0331):

Zusammensetzung/l:

| | |
|----------------|--------|
| Spezialpepton | 23,0 g |
| Stärke | 1,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| Agar | 10,0 g |

pH-Wert: $7,3 \pm 0,2$

39,0 g in 1,0 l Aqua dest. lösen

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

Abkühlung auf 50 °C

50 ml **defibriniertes Schafblut (Oxoid, Art.-Nr.: SR 50)**/l

Dreizucker-Eisen-Schrägagar (Merck, Art.-Nr. 1.03915.0500) (TSI-Schrägagar)

Zusammensetzung/l:

| | |
|---------------------------|---------|
| Pepton aus Casein | 15,0 g |
| Pepton aus Fleisch | 5,0 g |
| Fleischextrakt | 3,0 g |
| Hefeextrakt | 3,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| Lactose | 10,0 g |
| Saccharose | 10,0 g |
| D(+)-Glucose | 1,0 g |
| Ammoniumeisen(III)-citrat | 0,5 g |
| Natriumthiosulfat | 0,5 g |
| Phenolrot | 0,024 g |
| Agar | 12,0 g |

pH-Wert: $7,4 \pm 0,2$

65,0 g in 1,0 l Aqua dest. lösen, in Röhrchen abfüllen

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

Als Schrägagar mit ca. 2,5 cm Hochschicht erstarren lassen.

MÜLLER-HINTON-Blutagar (Merck, Art.-Nr. 1.05435.0500)

Zusammensetzung/l:

| | |
|------------------|--------|
| Fleischinfus | 2,0 g |
| Caseinhydrolysat | 17,5 g |
| Stärke | 1,5 g |
| Agar | 17,0 g |

pH-Wert: $7,4 \pm 0,2$

38,0 g in 1,0 l Aqua dest. lösen, in Röhrchen abfüllen
Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten
Abkühlung auf 47 °C
25 ml **defibriniertes Schafblut (Oxoid, Art.-Nr.: SR 50)**/475 ml

3.2.3 Reagenzien

Wasserstoffperoxidlösung 3 %

Bactident Oxidase zum Nachweis der Cytochromoxidase in Mikroorganismen (Merck, Art.-Nr. 1.13300.0001)

Natrium-Hippurat-Lösung

Zusammensetzung/l:

Natrium-Hippurat 10,0 g

PBS-Lösung:

Natriumchlorid 8,98 g

Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat 2,71 g

in 1 l Aqua dest. lösen und steril filtrieren

Ninhydrinlösung 3,5 %

Zusammensetzung/0,05 l:

Ninhydrin 1,75 g

Aceton 25,0 ml

Butanol 25,0 ml

Nalidixinsäureplättchen 30 µg

Cephalothinplättchen 30 µg

3.2.4 Verbrauchsmaterialien

Stomacherbeutel FBAG-03

Kunststoffpetrischalen

CampyGen, 2,5 l (Oxoid, Art.-Nr. CN 0025A)

Gram-Color-Färbeset (Merck, Art.-Nr. 1.11885.0001)

3.2.5 Geräte

Autoklav Gössner GVA 4.6

Stomacher Seward Laboratory Blender 400

Platinösen

Glaswaren (wie u. a. Pipetten, Erlenmeyerkolben, Steilbrustflaschen, Reagenzgläser)

pH-Meter

Bunsenbrenner Fireboy Tec No Mara

Schere, chirurgische Pinzette

Dampftopf Varioklav Control Unit DTE

Eppendorfpipette Eppendorf Reference
Hohlschliffobjektträger
Deckgläschen
Glasobjektträger
Rondoflam Fireboy Tec No Mara
Wasserbad Haake W 19
Brutschrank 42 °C Memmert Modell 700
Brutschrank 25 °C Memmert Modell TVB 506
Thermomixer 5737
Anaerobiertöpfe Oxoid
Magnetrührer IKA-Combimag RCT
Lichtmikroskop Carl Zeiss 467058-9901
Vortex Janke & Kunkel VF 2
Waage Sartorius U4100 und Sartorius LP 4200S
UV-Lampe 366 nm Handlampe 2-5067

3.3 Herstellung der Nährmedien

Bei sämtlichen verwendeten Nährmedien handelt es sich um getrocknete Fertigprodukte, die nach Angaben des Herstellers zubereitet und überprüft wurden. In der Regel wurde der Ablauf wie folgt gestaltet:

Das Trockenprodukt wurde in der empfohlenen Menge in einen sterilen Glaskolben von geeigneter Größe abgewogen und mit Aqua dest. entsprechend aufgefüllt. Unter Verwendung eines Magnetrührers wurde das Gemisch bis zur vollständigen Lösung des Trockenproduktes vermengt, gegebenenfalls dafür auch im Dampftopf erhitzt. Anschließend wurde das Nährmedium wie vorgegeben im Autoklaven sterilisiert. Eventuell notwendige Zusätze wie Blut, Nähr- oder Hemmstofflösungen wurden steril zubereitet und anschliessend nach Abkühlung auf 50 °C unter Rühren hinzugefügt. Feste Nährmedien wurden dann in geeignete sterile Petrischalen oder auch Röhrchen gegossen.

Von allen Nährmedien sind sowohl Sterilitäts- als auch pH-Kontrollen vorgenommen worden. Die Medien wurden bis zu ihrer Verwendung innerhalb der Lagerfrist bei 4 °C ± 1 °C aufbewahrt.

3.4 Material zum Nachweis von *Campylobacter* spp. durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System

3.4.1 Flüssige Nährmedien

Gepuffertes Peptonwasser

Zusammensetzung/l:

| | |
|---|--------|
| Pepton | 10,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat | 9,0 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 1,5 g |

25,5 g in 1,0 l Aqua dest. lösen

pH-Wert: 7,2 ± 0,2 bei 25 °C

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

3.4.2 Trockene Nährsubstanzen

Dehydriertes *Campylobacter* Nährmedium

SimPlate™ Campylobacter CI 100 (CORING-SYSTEM-Diagnostix, Code 1509028)

Lösungsmittel

steriles Aqua dest.

3.4.3 Reagenzien

Rifampicin-Additiv

Zusammensetzung/100 ml:

| | |
|------------|--------|
| Rifampicin | 0,25 g |
|------------|--------|

lösen in

| | |
|---------|----------------|
| Ethanol | 60,0 – 80,0 ml |
|---------|----------------|

auffüllen auf 100 ml mit Aqua dest.

Hemin-Additiv

Zusammensetzung/100 ml:

| | |
|------------|---------|
| NaOH 1N | 10,0 ml |
| Aqua dest. | 90,0 ml |
| Hemin | 0,55 g |

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

3.4.4 Verbrauchsmaterialien

Stomacherbeutel FBAG-03

SimPlate™ Platten (CORING-SYSTEM-Diagnostix, Code 1509021)

3.4.5 Geräte

Autoklav Gössner GVA 4.6

Stomacher Seward Laboratory Blender 400

Glaswaren (wie u. a. Pipetten, Erlenmeyerkolben, Steilbrustflaschen)

Waage Sartorius U4100 und Sartorius LP 4200S

3.5 Zusätzlich verwendetes Nährmedium zur Untersuchung dreier *E. coli*-Stämme

Fluorocult *E. coli*-Direktagar (Merck, Art.-Nr. 1.04038) (ECD-Agar)

Zusammensetzung/l:

| | |
|---|--------|
| Pepton aus Casein | 20,0 g |
| Lactose | 5,0 g |
| Natriumchlorid | 5,0 g |
| Gallesalzmischung | 1,5 g |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | 4,0 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 1,5 g |
| Tryptophan | 1,0 g |
| 4-Methylumbellyferyl- β -D-glucuronid | 0,07 g |
| Agar | 16,0 g |

pH-Wert: $7,0 \pm 0,2$

53,1 g in 1,0 l Aqua dest. lösen

Sterilisation: autoklavieren bei 121 °C, 15 Minuten

Die Herstellung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.6 Referenzstämme

Als Referenz zur Kontrolle der *Campylobacter*-Isolate aus den Proben dienen *C. coli* (DSM-Nr. 4689) und *C. jejuni* (DSM-Nr. 4688) der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), welche nach den Vorgaben der DSMZ kultiviert und in sterilen Kryoröhrchen des MAST DIAGNOSTICA Cryobank™-Systems bei -70 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden.

3.7 Untersuchungsmaterial

Bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials wurde dem keimspezifischen Auftreten in Lebensmitteln Rechnung getragen. So wurden zum Nachweis von *Campylobacter* spp. 100 Proben rohes Geflügelfleisch mit Haut sowohl von der Pute (n = 27) als auch vom Huhn (Vorversuch n = 16, Hauptversuch n = 73) aus dem Berliner Einzelhandel verwendet.

Alle Proben stammten aus in Deutschland zugelassenen Geflügelfleischzerlegebetrieben.

Die Fertigpackungen enthielten jeweils mindestens eine Hähnchenbrust, zwei Hähnchenschenkel mit Rückenteil, vier Unterschenkel oder acht Hähnchenflügel.

Zudem wurden auch Putenober- und -unterschenkel als weiteres Untersuchungsmaterial herangezogen, die bereits durch andere Methoden als natürlich mit *Campylobacter* kontaminiert getestet und bis zur weiteren Untersuchung tiefgekühlt bei höchstens -18 °C gelagert worden waren.

Als Probenmaterial kamen sowohl Teile der Haut als auch des Muskelfleisches zur Untersuchung.

Die Geflügelabschnitte wurden nach dem Einkauf in einer Kühlbox in das Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin transportiert und bis zu ihrer Untersuchung durchgehend bei einer Temperatur von 2–6 °C gekühlt und vor Ablauf des vom Hersteller angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums bzw. Anzeichen von Verderb (bei Ware aus der Bedienungstheke) untersucht.

Tab. 16 des Anhangs gibt einen Überblick darüber, welche Geflügelfleischsorte bei den einzelnen Versuchsansätzen verwendet wurde.

3.8 Methoden

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. erfolgte gemäß der ISO 10272:1995 (E)-Methode und den Anweisungen für das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System.

Außerdem wurde Koloniematerial von gekühlten Selektivnährböden derjenigen Proben per PCR überprüft, die mit Hilfe der ISO 10272:1995 (E)-Methode positiv auf *Campylobacter* spp. getestet worden waren. Hierbei wurde auch eine Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* vorgenommen. Andere *Campylobacter* spp. als die zuvor genannten konnten durch das angewendete Protokoll nicht näher spezifiziert werden und sind lediglich als *Campylobacter* spp. angezeigt.

3.8.1 Probenaufbereitungsverfahren A

Für die ersten 41 Versuchsansätze wurden 80 g Geflügelfleisch und Haut mit sterilem Werkzeug, wie abgeflammter Schere und chirurgischer Pinzette, vom Knochen präpariert und mittels einer dampfsterilisierten Moulinette homogenisiert. Davon wurden 25 g für die Untersuchung mit dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System und 40 g für die Untersuchung nach der Referenzmethode im ISO-MPN-Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter* nach ISO 10272 mit Speziesdifferenzierung 1:10 mit sterilem gepuffertem Peptonwasser in einem Stomacherbeutel mit Filtereinsatz verdünnt und für 60 s bei mittlerer Stufe gestomachert. Vier der 41 so hergestellten Erstverdünnungen wurden im Anschluß filtriert, um die störenden Fluoreszenzen durch die Probenmatrix, die zu Unsicherheiten bei der Ergebnisinterpretation des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems geführt hatten, gering zu halten.

3.8.2 Probenaufbereitungsverfahren B

Bei weiteren 59 Proben wurde auf das Homogenisieren des Ausgangsmaterials verzichtet, da sich immer wieder falsch-negative Ergebnisse bei den Positivkontrollen aufgrund von Fluoreszenzen im SimPlate™ *Campylobacter* CI-Verfahren ergaben.

Um eine möglichst homogene Verteilung der möglichen Kontaminanten in den dezimalen Verdünnungen für beide Probenansätze zu erhalten, wurden nun 160 g Muskelfleisch und Haut in einen sterilen Stomacherbeutel mit Filtereinsatz abgewogen. Anschließend wurde dieser 1:1 mit 160 ml sterilem gepuffertem Peptonwasser aufgefüllt und im Stomacher für 120 s bei höchster Stufe gewalkt.

3.8.3 Positiv- und Negativkontrollen

Zur Kontrolle sämtlicher Nährmedien, Nachweisverfahren und biochemischer Reaktionen sind parallel zu jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle (s. Tab. 23) und mehrere Positivkontrollen (s. Tab. 21 und Tab. 22) aus je einem *C. jejuni*-Stamm DSMZ Nr. 4688 und einem *C. coli*-Stamm DSMZ Nr. 4689 mitgeführt worden.

Bei den Positivkontrollen der ISO 10272:1995 (E)-Methode wurde auf einen quantitativen Nachweis verzichtet und lediglich ein qualitativer Nachweis von *Campylobacter* spp. durchgeführt.

Bei der Durchführung des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems sind ebenfalls parallel zu jedem Versuchsansatz zwei Negativkontrollen (s. Tab. 23) und vier Positivkontrollen mitgeführt worden (s. Tab. 21 und Tab. 22).

Dies erfolgte im Falle des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems bei beiden Spezies jeweils im Doppelansatz, da alle Kontrollen aufgrund der Eigenfluoreszenz der Probenmatrix sowohl mit als auch ohne Erstverdünnungslösung von Geflügelfleisch mit einem *Campylobacter*-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze angelegt wurden. So ergaben sich für jeden Versuchsansatz zwei Negativkontrollen und vier Positivkontrollen, zwei mit einem *C. jejuni*-Stamm DSMZ Nr. 4688 und zwei mit einem *C. coli*-Stamm DSMZ Nr. 4689. Die *Campylobacter*-Freiheit, das heißt ein Vorkommen unterhalb der Nachweisgrenze, wurde dadurch garantiert, dass Geflügelfleisch, welches in vorherigen Versuchen *Campylobacter* spp. negativ getestet worden war, verwendet wurde.

Zur Inokulation der Positivkontrollen, unabhängig von der Verwendung von Geflügelfleischverdünnung, wurde grobsinnlich eine möglichst immer gleich große Menge an Koloniematerial verwendet. Dabei handelte es sich in der Regel um 2–3 Kolonien, je nach Größe, um einen vollständigen Bewuchs aller Kavitäten der Platten des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems zu erzielen.

3.8.4 Kultivierung von *Campylobacter* spp. aus dem Probenmaterial gemäß ISO 10272:1995 (E)-Methode im ISO-MPN-Verfahren

3.8.4.1 ISO-MPN-Verfahren

Aufgrund von statistischen Berechnungen ist es mit einem multiplen (+/-)-Röhrchentest, dem MPN (= Most Probable Number)-Verfahren, möglich, die quantitative Keimzahl zu ermitteln. Dabei wird eine Probe im Mehrfachansatz untersucht. Zumeist handelt es sich um drei dezimale Verdünnungsstufen im Dreifachansatz. Jedes Probenansatzröhrchen wird auf die Abwesenheit des zu überprüfenden Keims getestet. Aufgrund der zahlenmäßigen Verteilung der bewachsenen Röhrchen leitet sich ein sogenannter Ergebniscode ab, dem sich in der dazugehörigen Tabelle eine Keimzahl zuordnen läßt. In Tab. 9 sind die verschiedenen Ergebniscodes bzgl. der positiv getesteten Röhrchen inklusive Vertrauensbereich und der entsprechenden Kategorie angegeben. Das Verfahren ist sehr materialaufwendig und wird im Regelfall bei niedrigen Keimzahlen bis 100/g bzw. ml angewendet (BAUMGART, 2004).

Tab. 9: Auswertungstabelle für die MPN-Technik aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG L 01.00-2 (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL), 1991)

MPN-Tabelle für Verdünnungsreihen mit dreifachem Ansatz

| Anzahl der Verdünnungsstufen: 3 Verdünnungen im Verhältnis: 1 0,1 0,01 Anzahl der Röhrchen: 3 3 3 | | | MPN | Kategorie | Vertrauensbereich ≥ 95% | |
|---|----------|-----------------|----------|-----------|----------------------------|--------|
| 3 × 1,00 | 3 × 0,10 | 3 × 0,01 g (ml) | | | Anzahl positive Ergebnisse | |
| 0 | 0 | 0 | < 0,30 | | 0,00 | 1,10 |
| 0 | 0 | 1 | 0,30 | 3 | 0,00 | 1,10 |
| 0 | 1 | 0 | 0,30 | 2 | 0,00 | 1,20 |
| 0 | 2 | 0 | 0,62 | 3 | 0,08 | 2,00 |
| 1 | 0 | 0 | 0,36 | 1 | 0,01 | 2,00 |
| 1 | 0 | 1 | 0,72 | 2 | 0,08 | 2,00 |
| 1 | 1 | 0 | 0,74 | 1 | 0,09 | 2,20 |
| 1 | 1 | 1 | 1,10 | 3 | 0,30 | 3,60 |
| 1 | 2 | 0 | 1,10 | 2 | 0,30 | 3,60 |
| 1 | 2 | 1 | 1,50 | 3 | 0,30 | 4,30 |
| 1 | 3 | 0 | 1,60 | 3 | 0,30 | 4,30 |
| 2 | 0 | 0 | 0,92 | 1 | 0,10 | 3,60 |
| 2 | 0 | 1 | 1,40 | 2 | 0,30 | 3,60 |
| 2 | 1 | 0 | 1,50 | 1 | 0,30 | 4,30 |
| 2 | 1 | 1 | 2,00 | 2 | 0,30 | 4,40 |
| 2 | 2 | 0 | 2,10 | 1 | 0,30 | 4,60 |
| 2 | 2 | 1 | 2,80 | 3 | 0,70 | 11,10 |
| 2 | 3 | 0 | 2,90 | 3 | 0,70 | 11,10 |
| 3 | 0 | 0 | 2,30 | 1 | 0,30 | 11,10 |
| 3 | 0 | 1 | 3,80 | 1 | 0,70 | 12,10 |
| 3 | 0 | 2 | 6,40 | 3 | 1,30 | 20,00 |
| 3 | 1 | 0 | 4,30 | 1 | 0,70 | 20,00 |
| 3 | 1 | 1 | 7,50 | 1 | 1,40 | 23,00 |
| 3 | 1 | 2 | 12,00 | 3 | 3,00 | 37,00 |
| 3 | 2 | 0 | 9,30 | 1 | 1,60 | 36,00 |
| 3 | 2 | 1 | 15,00 | 1 | 3,00 | 44,00 |
| 3 | 2 | 2 | 21,00 | 2 | 3,00 | 47,00 |
| 3 | 2 | 3 | 29,00 | 3 | 7,00 | 122,00 |
| 3 | 3 | 0 | 24,00 | 1 | 4,00 | 122,00 |
| 3 | 3 | 1 | 46,00 | 1 | 7,00 | 235,00 |
| 3 | 3 | 2 | 110,00 | 1 | 20,00 | 480,00 |
| 3 | 3 | 3 | > 110,00 | | | |

3.8.4.2 Anreicherung

Aus dem Probenaufbereitungsverfahren A wurden 40 g fein zerkleinertes Material bzw. aus dem Probenaufbereitungsverfahren B 40 ml des Homogenisats zur Herstellung der Anreicherung in einen Stomacherbeutel überführt und mit 360 ml steriler PRESTON-Bouillon versetzt, um eine dezimale Verdünnung herzustellen. Der so hergestellte Erstanatz wurde dann für 60 s bei mittlerer Stufe im Stomacher gewalkt.

Daraus wurden gemäß den Vorgaben des ISO-MPN-Verfahrens drei Verdünnungsstufen in dreifacher Ausführung hergestellt. Aus dem Stomacherbeutel wurden zunächst 4 ml der steril filtrierten Flüssigkeit in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 36 ml steriler PRESTON-Bouillon eine Dezimalstufe höher verdünnt. Mit dieser 1/100 Verdünnung des Probenmaterials wurden drei sterile Reagenzgläser zu je 10 ml befüllt.

Außerdem wurden jeweils dreimal 100 ml der 1/10 Verdünnung in je einen 100 ml-Erlenmeyerkolben und dreimal 10 ml in je ein Reagenzglas überführt.

Damit ergeben sich aus einer Probe drei Erlenmeyerkolben zu je 100 ml (= 10 g Probenmaterial), drei Reagenzgläser zu 10 ml (= 1 g Probenmaterial) und weitere drei Reagenzgläser zu 10 ml (= 0,1 g Probenmaterial).

Alle Röhrchen wurden unter Zugabe von CampyGen™ der Firma Oxoid zur Erzeugung einer mikroaeroben Atmosphäre in Anaerobiertöpfen bei 42 °C (± 1 °C) für 18 h bebrütet.

3.8.4.3 Beimpfung von Nährböden und Identifizierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Röhrchen mittels Vortex bzw. der Erlenmeyerkolben durch Schwenken vermengt und anschließend mit einer ausgeglühten Platinöse auf die Selektivnährbodenplatten, KARMALI- und PRESTON-Agar, ausgestrichen. Dabei wurden die Agarplatten jeweils gedrittelt, sodass die drei Ausstriche einer Verdünnungsstufe sich jeweils auf nur einer PRESTON- bzw. einer KARMALI-Agarplatte befanden.

Nach einer weiteren Inkubation der beimpften Agarplatten bei 42 °C (± 1 °C) für mindestens 48 h bis maximal 72 h in Anaerobiertöpfen unter mikroaeroben Bedingungen wurde das Koloniewachstum beurteilt und mit den Referenzstämmen verglichen.

Der Verdacht auf Vorliegen von *Campylobacter* spp. bestand, wenn sich die Kolonien auf den beiden Selektivnährböden als grau, flach und glänzend mit einem Durchmesser von 1–2 mm darstellten. Die Erfahrung hat gezeigt, dass der *Campylobacter* spp.-Verdacht in der weiteren Untersuchung nicht bestätigt werden konnte, wenn nur der PRESTON-Selektivnährboden mit verdächtigen Kolonien bewachsen war, der parallel dazu angesetzte KARMALI-Selektivnährboden aber unbewachsen blieb oder untypische Kolonien aufwies.

3.8.4.4 Bestätigungsverfahren

Von jeder Verdünnungsstufe wurden, wenn vorhanden, fünf verdächtige, gut abgrenzbare Einzelkolonien zur weiteren Diagnostik ausgewählt.

3.8.4.5 Gram-Färbung

Zunächst wurde ein Grampräparat nach Anleitung des Herstellers des Kits von jeder verdächtigen Kolonie angefertigt. Erwies sich der Mikroorganismus im Grampräparat bei lichtmikroskopischer Betrachtung als gramnegatives, gewundenes, relativ kleines Stäbchen und somit als *Campylobacter*-verdächtig, schloss sich eine Prüfung im so genannten „Hängenden Tropfen“ von jeder der fünf ausgewählten verdächtigen Kolonien an.

3.8.4.6 Hängender Tropfen

Koloniematerial der fünf unter 3.8.4.5 ausgewählten verdächtigen Kolonien wurde in je 1 ml Brucella Broth suspendiert. Ein Tropfen daraus wurde mit Hilfe einer abgeflamten Platinöse auf ein Deckgläschen gebracht. Auf dieses wurde an allen vier Ecken ein wenig Paraffin aufgetragen und darauf ein Hohlsliffobjektträger derart gelegt, dass durch Adhäsion das Deckgläschen haften blieb. Der Tropfen konnte beim Umdrehen der Konstruktion frei in die Vertiefung des Hohlsliffobjektträgers hineinragen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die im „Hängenden Tropfen“ befindlichen Mikroorganismen auf Beweglichkeit und Morphologie beurteilt. Zeigten sich korkenzieherförmige kleine Mikroorganismen mit spiraligen Bewegungen, erfolgten die im Weiteren beschriebenen biochemischen Untersuchungen.

Da für die biochemischen Untersuchungen gut isolierte Einzelkolonien benötigt wurden, mussten diese durch eine erneute Anzucht gewonnen werden. Hierfür wurde ein Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich von dem verdächtigen, in Brucella Bouillon suspendierten Koloniematerial auf einer sterilen Columbia-Blutagarplatte angelegt. Diese wurde zur Anzucht mikroaerob bei 42 °C (± 1 °C) für 24 h bebrütet.

3.8.4.7 Wachstum bei 25 °C

Das so gewonnene Koloniematerial wurde zur Inokulation eines mit 10 ml Brucella Bouillon befüllten Röhrchens verwendet. Dieses wurde bei 25 °C unter mikroaeroben Bedingungen für eine Dauer von 2 bis 5 d bebrütet, um das Wachstum zu überprüfen. Ließ sich nach dieser Zeit eine Trübung feststellen, hatte ein Wachstum stattgefunden, welches die Anwesenheit von *Campylobacter* in Reinkultur ausschloss.

3.8.4.8 Biochemische Tests

Die Anwesenheit von Oxidase wurde mittels eines Teststreifens der Firma Merck überprüft. Verdächtiges Koloniematerial wurde hierfür mit einer ausgeglühten Impföse aufgenommen und auf das dafür vorgesehene Testfeld des Streifens aufgetragen. Ein positives Ergebnis wurde nach einer Zeitspanne von 20–60 s durch einen Farbumschlag in dunkelblau bis violett-schwarz angezeigt.

Für einen kombinierten biochemischen Test mittels TSI-Agar wurde ein Röhrchen TSI-Schrägagar mit Koloniematerial von der zuvor angelegten Columbia-Blutagarplatte inokuliert. Zunächst wurde Koloniematerial mit einer Platinöse meanderförmig auf die Agaroberfläche vom Boden des Röhrchens zur Öffnung hin aufgebracht und anschließend der Agar mit derselben Impföse eingestochen.

Die Beurteilung der biochemischen Reaktionen ist den Tab. 2 und Tab. 3 des Literaturteils zu entnehmen.

Zur Überprüfung einer eventuell vorhandenen Katalaseaktivität wurde Material von auf dem TSI-Schrägagar gewachsenen Kolonien verwendet, das auf einem Objektträger in einen vorgelegten Tropfen 3 %-iger wässriger Wasserstoffperoxidlösung eingerieben wurde. Der Test ist als positiv zu bewerten, wenn innerhalb von 30 s eine erkennbare Bläschenbildung stattfindet.

Zur Messung der Empfindlichkeit auf Nalidixinsäure und Cephalothin wurde die Reaktion im Agardiffusionsverfahren überprüft. Dafür wurden 5 ml einer Brucella-Bouillon mit Koloniematerial der verdächtigen Probe von der angelegten Columbia-Blutagarplatte beimpft und bis zum Auftreten einer Trübung mikroaerob bei 42 °C etwa 24 h bebrütet. Ein Milliliter dieser Anreicherung wurde gleichmäßig mit einem sterilen Glasspatel auf die gesamte Oberfläche einer MÜLLER-HINTON-Blutagarplatte (MHB) verteilt. Nach fünf Minuten wurde eventuell vorhandene Restflüssigkeit abgegossen und die Platte im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurden auf der Agaroberfläche je ein Nalidixinsäure- und ein Cephalothinplättchen in größtmöglichem Abstand zueinander und zum Plattenrand aufgebracht und der Nährboden mikroaerob bei 42 °C für 48 h inkubiert. Rasenwachstum, das bis an die Plättchen heranreichte, wurde als positiv und die Ausbildung einer wachstumsfreien Zone jeglicher Größe als negativ beurteilt.

Die Fähigkeit zur Spaltung von Hippursäure wurde überprüft, indem in einem Eppendorfgesäß 0,4 ml Hippursäure mit Koloniematerial von der für biochemische Tests angelegten Columbia-Blutagarplatte suspendiert wurde. Anschließend wurde das Röhrchen für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 37 °C bebrütet. Danach wurde das Inkubat vorsichtig mit 0,2 ml Ninhydrinlösung überschichtet und weitere zehn Minuten im Wasserbad bei 37 °C belassen. Wenn sich ein dunkelvioletter Ring an der Flüssigkeitsoberfläche bildete, konnte die Reaktion als positiv bewertet werden.

Abb. 3 zeigt ein Verlaufsdiagramm für das gewählte ISO-MPN-Verfahren gemäß ISO 10272:1995.

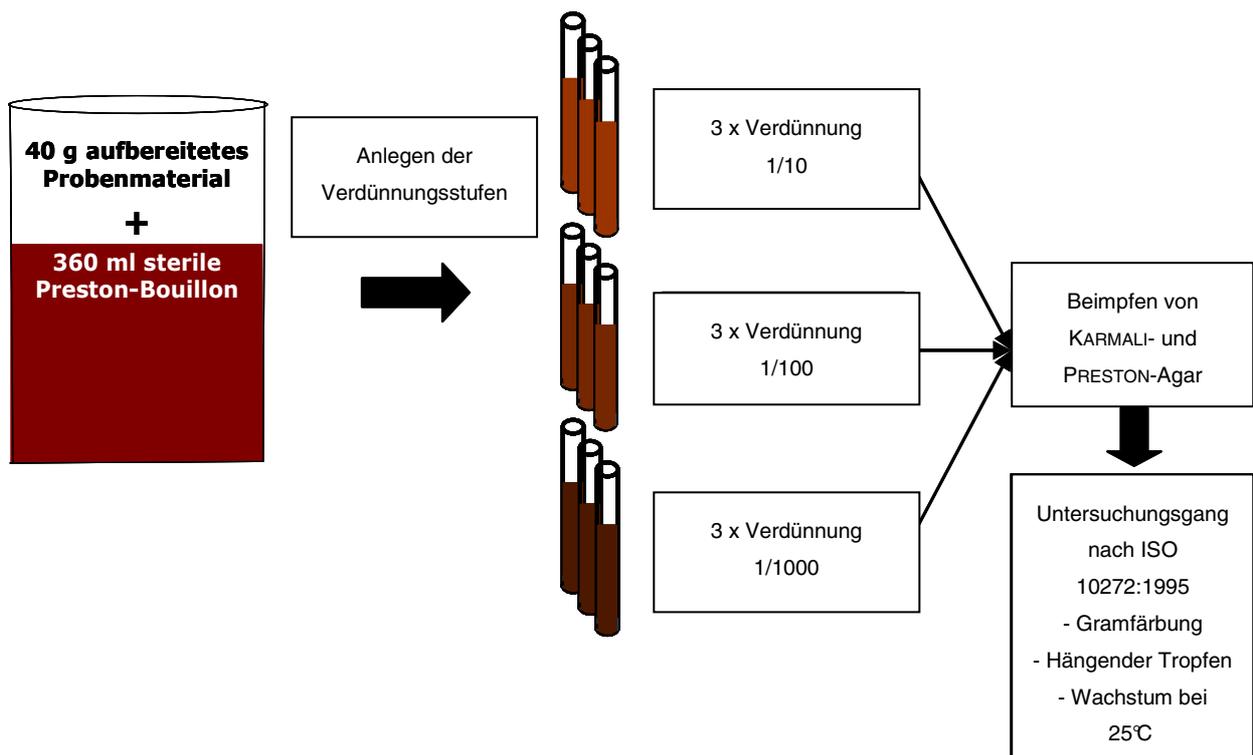


Abb. 3: Schematische Darstellung der Untersuchung nach ISO 10272:1995 im ISO-MPN-Verfahren

3.8.5 Nachweis von *Campylobacter* spp. durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System

Die Anreicherungen sowie die anschließenden Untersuchungen erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers.

Aus Probenaufbereitungsverfahren A wurden 25 g fein zerkleinertes Probenmaterial bzw. aus dem Gewinnungsverfahren B 25 ml der Spülflüssigkeit in einen Stomacherbeutel im Verhältnis 1:10 mit gepuffertem Peptonwasser aufgefüllt und gestomachert, um eine erste dezimale Verdünnung herzustellen.

Das dehydrierte *Campylobacter*-Nährmedium des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems wurde mit 9,5 ml sterilem deionisiertem Wasser versetzt und bis zu seiner vollständigen Lösung geschüttelt. Anschließend wurden 0,025 ml Rifampicin-Additiv und 0,04 ml Hemin-Additiv mit Hilfe einer Eppendorfpipette hinzugefügt. Die so vorbereitete Nährlösung wurde sofort verwendet. Nach Absprache mit dem Hersteller wurde diese mit 0,5 ml der zuvor bereitgestellten dezimalen Erstverdünnung inokuliert und anschließend durch Schwenken der geschlossenen Fiole vermischt.

Die beimpfte Nährlösung wurde in die Mitte einer dem Testkit zugehörigen Einweg-Kunststoffschale gegossen, welche jeweils 84 Kavitäten besaß und einen Wattetupfer enthielt. Jede der Kavitäten musste dabei mit ausreichend inokulierter Lösung durch Schwenken befüllt werden. Bei der gleichmäßigen Befüllung der Kavitäten war darauf zu achten, dass regelmäßig in den Kavitäten entstandene Luftblasen durch vorsichtiges Klopfen der Kunststoffschale auf die Unterlage entfernt werden. Waren alle Kavitäten befüllt, wurde die überstehende Flüssigkeit durch Schräghalten der Platte auf den anliegenden Wattetupfer gegossen und von diesem aufgenommen.

Nach einer Inkubation von 48 bis 52 h bei 42 °C unter mikroaerober Atmosphäre, bei der die Schalen auf dem Klarsichtkunststoffdeckel gelagert wurden, zeigten *Campylobacter* spp.-verdächtige Kavitäten eine Rotfärbung. Im Rahmen der Auswertung wurde auch eine eventuell auftretende Rotfärbung des Wattetupfers im Bereich der aufgenommenen Inokulationslösung berücksichtigt. Die Anwesenheit von *Campylobacter* spp. war bei dieser Methode bestätigt, wenn die gefärbten Kavitäten bzw. der Tupfer unter 366 nm UV-Licht mit einem Abstand von 5 cm nicht blau fluoreszierten. Abb. 5 enthält das Verlaufsdiagramm für den Analysengang.

Die Auswertung erfolgte gemäß der Anweisung des Herstellers. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Anzahl der rot gefärbten und nicht fluoreszierenden Kavitäten ermittelt. Diese Zahl entspricht bestätigten *Campylobacter*-Zellen (s.

Abb. 4). Bei einem Einsatz von 0,5 ml einer 1:10-Probenverdünnung konnten so Zahlen von 40–14.760 KbE/g ermittelt werden, wobei ein Wert von 20 KbE/g galt, wenn keine positiven Kavitäten, jedoch ein positiv zu wertender Wattetupfer vorlag. Tab. 10 ist auf die Auswertung der SimPlate™-Platten bei Einsatz von 1 g Probenmaterial, beispielsweise 1 g Spülflüssigkeit, ausgelegt. Für die vorliegenden Versuche wurden jedoch lediglich 0,5 ml einer 1:10-verdünnten Probe eingesetzt, daher musste die Auswertungstabelle modifiziert werden, indem das Ergebnis mit dem Faktor 20 multipliziert wurde. Tab. 11 führt die jeweiligen Vertrauensbereiche des Nachweissystems bezüglich der Anzahl der positiven Wells auf.



Abb. 4: SimPlate™-Platten nach der Bebrütung

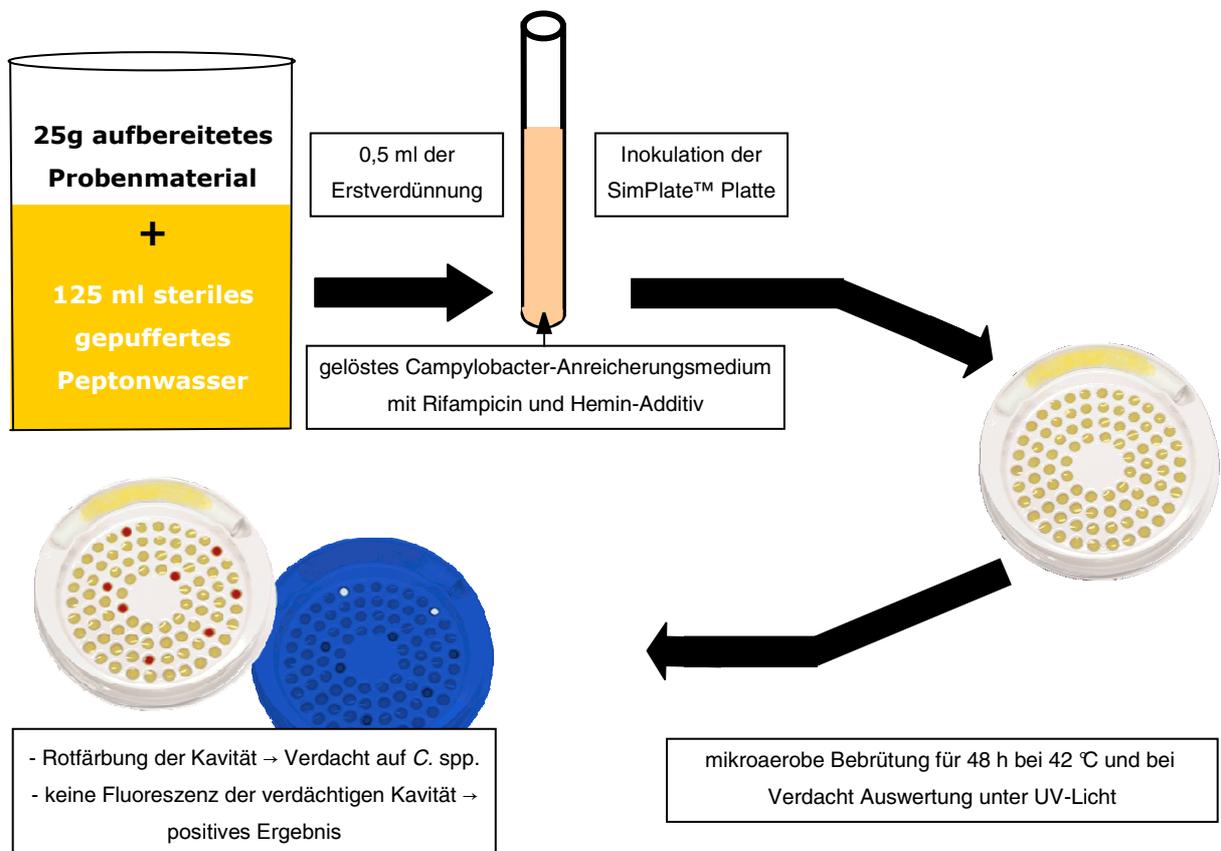


Abb. 5: Schematischer Ablauf der Untersuchung unter Anwendung des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems

Tab. 10: Auswertungstabelle für das SimPlate™ Campylobacter CI-System (SCHUSTER, 2002b)

| SimPlate™ Normal Counting Range (NCR) Conversion Table | | |
|--|------------------------------|------------------------------|
| positive wells = population* | positive wells = population* | positive wells = population* |
| 1 = 2 | 29 = 70 | 57 = 190 |
| 2 = 4 | 30 = 74 | 58 = 196 |
| 3 = 6 | 31 = 76 | 59 = 20 |
| 4 = 8 | 32 = 80 | 60 = 208 |
| 5 = 10 | 33 = 84 | 61 = 216 |
| 6 = 12 | 34 = 86 | 62 = 224 |
| 7 = 14 | 35 = 90 | 63 = 232 |
| 8 = 16 | 36 = 94 | 64 = 240 |
| 9 = 18 | 37 = 96 | 65 = 248 |
| 10 = 22 | 38 = 100 | 66 = 256 |
| 11 = 24 | 39 = 104 | 67 = 266 |
| 12 = 26 | 40 = 108 | 68 = 276 |
| 13 = 28 | 41 = 112 | 69 = 288 |
| 14 = 30 | 42 = 116 | 70 = 298 |
| 15 = 32 | 43 = 120 | 71 = 312 |
| 16 = 36 | 44 = 124 | 72 = 324 |
| 17 = 38 | 45 = 128 | 73 = 338 |
| 18 = 40 | 46 = 132 | 74 = 354 |
| 19 = 42 | 47 = 136 | 75 = 372 |
| 20 = 46 | 48 = 142 | 76 = 392 |
| 21 = 48 | 49 = 146 | 77 = 414 |
| 22 = 50 | 50 = 150 | 78 = 440 |
| 23 = 54 | 51 = 156 | 79 = 470 |
| 24 = 56 | 52 = 160 | 80 = 508 |
| 25 = 58 | 53 = 166 | 81 = 556 |
| 26 = 62 | 54 = 172 | 82 = 624 |
| 27 = 64 | 55 = 178 | 83 = 738 |
| 28 = 68 | 56 = 184 | 84 = >738 |

*If there are no positive wells, and the sponge is positive, population is 1. If there are no positive wells, and the sponge is negative, population is <1.

Tab. 11: Vertrauensbereich des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems (SCHUSTER, 2003a)

| # Positive Wells | MPN | 95 % confidence limits | | # Positive Wells | MPN | 95 % confidence limits | |
|------------------|-----|------------------------|-------|------------------|------|------------------------|-------|
| | | lower | upper | | | lower | upper |
| 0 | <2 | <0.3 | <14 | 43 | 120 | 88 | 162 |
| 1 | 2 | 0.3 | 14 | 44 | 124 | 91 | 167 |
| 2 | 4 | 1 | 16 | 45 | 128 | 95 | 173 |
| 3 | 6 | 2 | 19 | 46 | 132 | 98 | 178 |
| 4 | 8 | 3 | 22 | 47 | 137 | 102 | 183 |
| 5 | 10 | 4 | 25 | 48 | 141 | 106 | 189 |
| 6 | 12 | 6 | 17 | 49 | 146 | 109 | 195 |
| 7 | 15 | 7 | 30 | 50 | 151 | 113 | 201 |
| 8 | 17 | 8 | 33 | 51 | 156 | 117 | 207 |
| 9 | 19 | 10 | 36 | 52 | 161 | 121 | 213 |
| 10 | 21 | 11 | 39 | 53 | 166 | 125 | 220 |
| 11 | 23 | 13 | 42 | 54 | 171 | 130 | 227 |
| 12 | 26 | 15 | 45 | 55 | 177 | 134 | 249 |
| 13 | 28 | 16 | 48 | 56 | 183 | 139 | 241 |
| 14 | 30 | 18 | 51 | 57 | 189 | 144 | 249 |
| 15 | 33 | 20 | 54 | 58 | 195 | 149 | 257 |
| 16 | 35 | 22 | 58 | 59 | 202 | 154 | 265 |
| 17 | 38 | 23 | 61 | 60 | 209 | 159 | 273 |
| 18 | 40 | 25 | 64 | 61 | 216 | 165 | 282 |
| 19 | 43 | 27 | 67 | 62 | 223 | 171 | 292 |
| 20 | 45 | 29 | 70 | 63 | 231 | 177 | 302 |
| 21 | 48 | 31 | 74 | 64 | 239 | 183 | 312 |
| 22 | 51 | 33 | 77 | 65 | 248 | 190 | 323 |
| 23 | 53 | 35 | 80 | 66 | 257 | 197 | 335 |
| 24 | 56 | 38 | 84 | 67 | 266 | 204 | 347 |
| 25 | 59 | 40 | 87 | 68 | 276 | 212 | 361 |
| 26 | 62 | 42 | 91 | 69 | 287 | 220 | 375 |
| 27 | 65 | 44 | 94 | 70 | 299 | 229 | 390 |
| 28 | 68 | 47 | 98 | 71 | 311 | 238 | 407 |
| 29 | 71 | 49 | 102 | 72 | 324 | 248 | 425 |
| 30 | 74 | 51 | 106 | 73 | 339 | 258 | 444 |
| 31 | 77 | 54 | 109 | 74 | 355 | 270 | 466 |
| 32 | 80 | 56 | 113 | 75 | 372 | 282 | 491 |
| 33 | 83 | 59 | 117 | 76 | 392 | 296 | 519 |
| 34 | 86 | 62 | 121 | 77 | 414 | 311 | 551 |
| 35 | 90 | 64 | 126 | 78 | 440 | 328 | 589 |
| 36 | 93 | 67 | 130 | 79 | 470 | 348 | 636 |
| 37 | 97 | 70 | 134 | 80 | 507 | 371 | 695 |
| 38 | 100 | 73 | 139 | 81 | 555 | 398 | 775 |
| 39 | 104 | 76 | 143 | 82 | 623 | 432 | 899 |
| 40 | 108 | 79 | 148 | 83 | 738 | 476 | 1146 |
| 41 | 112 | 82 | 152 | 84 | >738 | >476 | >1146 |
| 42 | 116 | 85 | 157 | | | | |

3.8.6 Inokulation von Platten des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems mit drei verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Die Überprüfung der rot gefärbten Kavitäten der bebrüteten SimPlate™ Campylobacter CI-System-Platten unter einer UV-Lampe wurde durchgeführt, um andere Nicht-*Campylobacter* spp. auszuschließen. Denn auch andere Mikroorganismen, zumeist *E. coli*, sind unter den gegebenen Bedingungen wachstumsfähig und würden durch eine TTC-Reduktion ebenso eine Rotfärbung bewirken. Eine solche Reaktion von Kavitäten ohne die Anwesenheit von *Campylobacter* spp. kann laut Vertrieb in ca. 2 % der Fälle vorkommen (SCHUSTER, 2003b). Im Gegensatz zu *Campylobacter* spp. würden jedoch *E. coli*-Stämme eine Fluoreszenz zeigen. Leider konnte die vertreibende Firma keine Informationen darüber liefern, welche *E. coli*-Isolate hier angesprochen wären. Da es aufgrund der Schwierigkeiten bei der Auswertung bezüglich der Fluoreszenz hilfreich erschien, eine Negativkontrolle bezüglich dieser Eigenschaft mitzuführen, wurden drei am Institut für Lebensmittelhygiene verfügbare *E. coli*-Stämme mit dem SimPlate™ Campylobacter CI-System überprüft. Dabei handelte es sich um *E. coli* DSM 1103, *E. coli* DSM 30083 und einen nicht näher definierten laboreigenen Stamm.

Das trockene *Campylobacter*-Nährmedium des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems wurde in 0,9 ml sterilem Aqua dest. gelöst und mit 0,5 ml einer 1:10-Erstverdünnung von „*Campylobacter*-freiem“ Geflügelfleisch, hier Putenfleisch (s. 3.8.3), versetzt. Zur Inokulation des Nährmediums mit *E. coli* wurden 10 ml-Röhrchen mit sterilem gepuffertem Peptonwasser mit Koloniematerial jeweils eines der o. g. *E. coli*-Stämme inokuliert und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Die entstandene *E. coli*-Suspension wurde dekadisch verdünnt und je 0,5 ml der 5. bzw. 6. Verdünnungsstufe zur Inokulation des *Campylobacter*-Nährmediums des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems verwendet.

Die Untersuchung wurde anschließend nach Herstellerangaben für das SimPlate™ Campylobacter CI-System durchgeführt.

Parallel dazu fand eine quantitative Keimzahlbestimmung der jeweiligen Verdünnungsstufe mit Hilfe des Spatelverfahrens statt. Hierfür wurde 1 ml der 5. bzw. 6. Verdünnungsstufe auf eine sterile *E. coli*-Direkt-Agarplatte gebracht und mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Nach einer Bebrütungszeit von 24 h bei 44 °C erfolgte die quantitative Auswertung der Agarplatte unter einer UV-Lampe.

3.8.7 Bestätigung der durch ISO 10272:1995 (E)-Methode nachgewiesenen *Campylobacter* spp. durch PCR

Sowohl eine Negativ- als auch je eine Positivkontrolle mit einem *C. jejuni*-Stamm der DSMZ Nr. 4688 und einem *C. coli*-Stamm der DSMZ Nr. 4689 wurden mitgeführt.

Es wurde von nahezu allen Proben, deren Kontamination mit *Campylobacter* spp. durch die ISO 10272:1995 (E)-Methode nachgewiesen worden war, entsprechendes Koloniematerial von den Selektivnährböden gewonnen, mit einer sterilen Platinöse jeweils in ein steriles

Kryoröhrchen des MAST DIAGNOSTICA Cryobank™ Systems überführt und bei -80 °C bis zur Untersuchung mittels PCR im Bundesinstitut für Risikobewertung gelagert.

Zur Untersuchung im Bundesinstitut für Risikobewertung wurde das durch WANG et al. (2002) veröffentlichte Multiplex-PCR (mPCR) Protokoll angewendet. In Tab. 12 sind die dabei verwendeten Primersequenzen, in Tab. 13 die Zusammensetzung des Primermixes und in Tab. 14 die verwendeten PCR-Programme aufgelistet. Ursprünglich bestand die Methode aus einer Kombination einer internen Positivkontrolle, die auf die 23S-rDNS ausgerichtet ist und mit allen *Campylobacter* spp. ein Amplifikat ergibt, und Primern für Gene der fünf klinisch relevantesten *Campylobacter* spp.. Bei den Genen handelte es sich für *C. jejuni* um das *hipO*-Gen, für *C. coli* und *C. upsaliensis* um das *glyA*-Gen (Serin-Hydroxymethyltransferase) und für *C. fetus* ssp. *fetus* um das *sapB2*-Gen (LICK et al., 2007). Für die vorliegende Arbeit wurden lediglich Primer zum Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* eingesetzt. Sofern andere *Campylobacter* spp. als diese beiden vorlagen, wurde dies lediglich durch die interne Positivkontrolle über die 23S-rDNS angezeigt. Eine Angabe der Spezies war in einem solchen Fall nicht möglich. Es konnte dann nur die Aussage getroffen werden, dass eine *Campylobacter* spp. vorlag, bei der es sich jedoch weder um *C. jejuni* noch um *C. coli* handelte. In Abb. 6 werden die einzelnen Arbeitsschritte der durchgeführten PCR-Untersuchung als Fließschema dargestellt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 3 %-igen Agarosegel.

Tab. 12: Verwendete Primer nach WANG et al. (2002)

| Zielgene | Primer | Sequenz forward [1] 5'----3' | Sequenz reverse [2] 5'----3' | PCR-Produkt |
|----------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| hipO-Gen | Cj[1/2] | ACTTCTTTATTGCTTGCTGC | GCCACAACAAGTAAAGAAGC | 323 bp |
| glyA-Gen | Cc[1/2] | GTAAAACCAAAGCTTATCGTG | TCCAGCAATGTGTGCAATG | 126 bp |
| | 23SrRNA[1/2] | TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG | ATCAATTAACCTTCGAGCACCG | 650 bp |

Tab. 13: Zusammensetzung eines 25 µl-mPCR-Ansatzes und des dazugehörigen Primermixes für die Untersuchung einer Probe

| PCR-Komponenten | Menge [µl] |
|---------------------------------------|-------------|
| Aqua bidest. | 9,09 |
| 10XPCR-Puffer (o. MgCl ₂) | 2,5 |
| MgCl ₂ (50 mM) | 4,0 |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1,5 |
| Primermix | 5,4 |
| Taq-Polymerase (5 U/ µl) | 0,01 |
| DNS | 2,5 |
| gesamt | 25,0 |

| Primermix bestehend aus forward [1]- und reverse [2]-Primer | Menge [µl] | gesamt [µl] |
|---|------------|-------------|
| Cj[1/2] | 0,25 | 0,5 |
| Cl[1/2] | 0,25 | 0,5 |
| Cc[1/2] | 0,5 | 1,0 |
| Cff[1/2] | 0,5 | 1,0 |
| Cu[1/2] | 1,0 | 2,0 |
| 23SrRNA[1/2] | 0,2 | 0,4 |
| gesamt | | 5,4 |

Tab. 14: PCR-Programme

| Cycler-Programm* | | | |
|---|-----------------------|---------------------|------------------|
| Zyklenanzahl | Denaturierung (94 °C) | Annealing (55,5 °C) | Synthese (72 °C) |
| 1 | 4 min | | |
| 30 | 45 s | 45 s | 45 s |
| 1 | | | 4 min |
| Nach Beendigung sorgt ein Zusatzschritt für das Kühlhalten der PCR-Proben bei 4 °C. | | | |

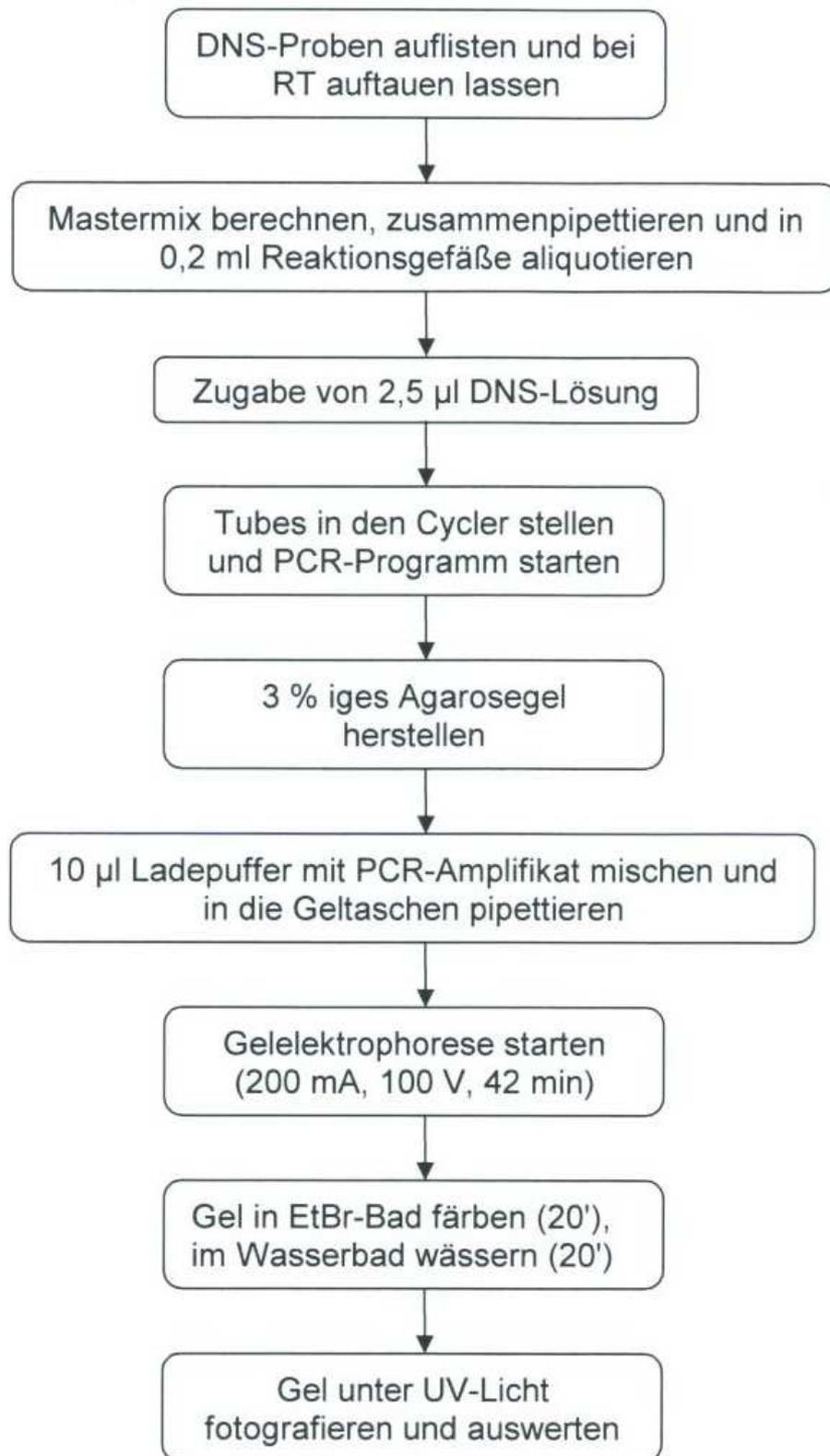


Abb. 6: Fließschema der Multiplex-PCR Untersuchung aus der Laboranweisung des BfR OE-Mikrobiologie – LA 138-1 nach WANG et al. (2002)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Im Laufe der Untersuchungsreihe musste die Bearbeitung der Geflügelfleischproben zur Herstellung der Erstverdünnung verändert werden. Da ein möglichst identischer Keimgehalt in den Parallelproben für das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System und das ISO-MPN-Verfahren bereitgestellt werden sollte, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurde das Probenmaterial zunächst fein zerkleinert (s. 3.8.1 Probenaufbereitungsverfahren A). Aufgrund der intensiven Homogenisierung blieben trotz steriler Filtration kleinste Gewebepartikel in den Verdünnungslösungen zurück, die bei der Auswertung störende Fluoreszenzen hervorriefen. Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden Fluoreszenzen, die bei vorliegender Rotfärbung trotzdem zu einem negativen Ergebnis geführt hätten, nicht berücksichtigt, weil es sich offensichtlich um falsch-negative Ergebnisse handelte. Die Berechtigung hierfür ergab sich aus der Tatsache, dass sogar Positivkontrollen aufgrund der Fluoreszenz „negative“ Resultate erbrachten. Eine anschließende Filtration der Erstverdünnung führte zu keiner Verbesserung in dieser Hinsicht.

Mit der Verwendung von unzerkleinertem Probenmaterial zur Herstellung der Erstverdünnung, das lediglich gestomachert wurde (s. 3.8.2 Probenaufbereitungsverfahren B), konnte eine Eigenfluoreszenz zwar nicht immer vollständig unterdrückt, aber doch soweit geschwächt werden, dass eine Fehlinterpretation nahezu auszuschließen war. Der Hersteller selbst gibt in der dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System beigefügten Arbeitsanweisung den Hinweis, dass einige Fleischproben schwache Fluoreszenzen des Mediums verursachen und daher nur solche Kavitäten zu berücksichtigen sind, die signifikant stärker als das Medium blau fluoreszieren (BIOCONTROL, 2002).

4.2 Vorversuche

Die Vorversuche dienten überwiegend dazu, sich mit den einzelnen Arbeitsschritten und organisatorischen Abläufen der beiden Untersuchungsverfahren vertraut zu machen. Jedoch zeigte sich hier bereits, dass die Herstelleranweisung für die SimPlate™-Platte keine optimalen Resultate erbringt. Zwar wurden von den 16 durch das ISO-MPN-Verfahren untersuchten Proben lediglich zwei positiv auf *Campylobacter* spp. getestet, aber davon nur eine (V2) simultan vom SimPlate™ *Campylobacter* CI-System als positiv detektiert. Diese SimPlate™-Platte (V2) zeigte nach der vorgeschriebenen Bebrütungsdauer von 48 h eine *Campylobacter*-Dichte von 40 KbE/g Probenmaterial an. Folgte weitere 48 h Bebrütung, ergab sich im Anschluss eine *Campylobacter*-Zahl von 2400 KbE/g, was in etwa im Größenbereich des Ergebnisses der ISO-MPN-Methode lag. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die vom Hersteller empfohlene Bebrütungsdauer für das System in dieser

Zusammensetzung nicht ausreicht, um eine vollständige Resusozitation der subletal geschädigten *Campylobacter* spp. zu erzielen. Weil eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf mehr als 48 h jedoch nicht den Vorgaben des Herstellers für eine Schnellmethode und damit auch nicht den Rahmenbedingungen der vorliegenden Studie entsprach, wurden weitere Versuche dieser Art nicht durchgeführt. Auch HAZELEGER et al. machten (2005) die Erfahrung, dass durch eine Verlängerung der Bebrütungszeit der SimPlate™-Platten eine höhere Nachweisrate erzielt und so die Sensitivität verbessert werden kann.

Abb. 7 zeigt die Häufigkeitsverteilung der positiven und negativen *Campylobacter* spp.-Detektionen für beide durchgeführten Verfahren. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Tab. 17 des Anhanges aufgeführt. Da sich der *Campylobacter*-Gehalt der beiden durch das ISO-MPN-Verfahren positiv getesteten Proben jeweils oberhalb der Nachweisgrenze des SimPlate™-Verfahrens befand, kann an dieser Stelle auf eine entsprechende Einteilung in positive Ergebnisse ober- bzw. unterhalb der Nachweisgrenze des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems verzichtet werden.

Insgesamt wurden 16 Vorversuche durchgeführt, wobei sich in nur zwei Proben durch das ISO-MPN-Verfahren und in nur einer davon durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System *Campylobacter* spp. nachweisen ließ. Eine Speziesbestimmung wurde in beiden Fällen nicht durchgeführt.

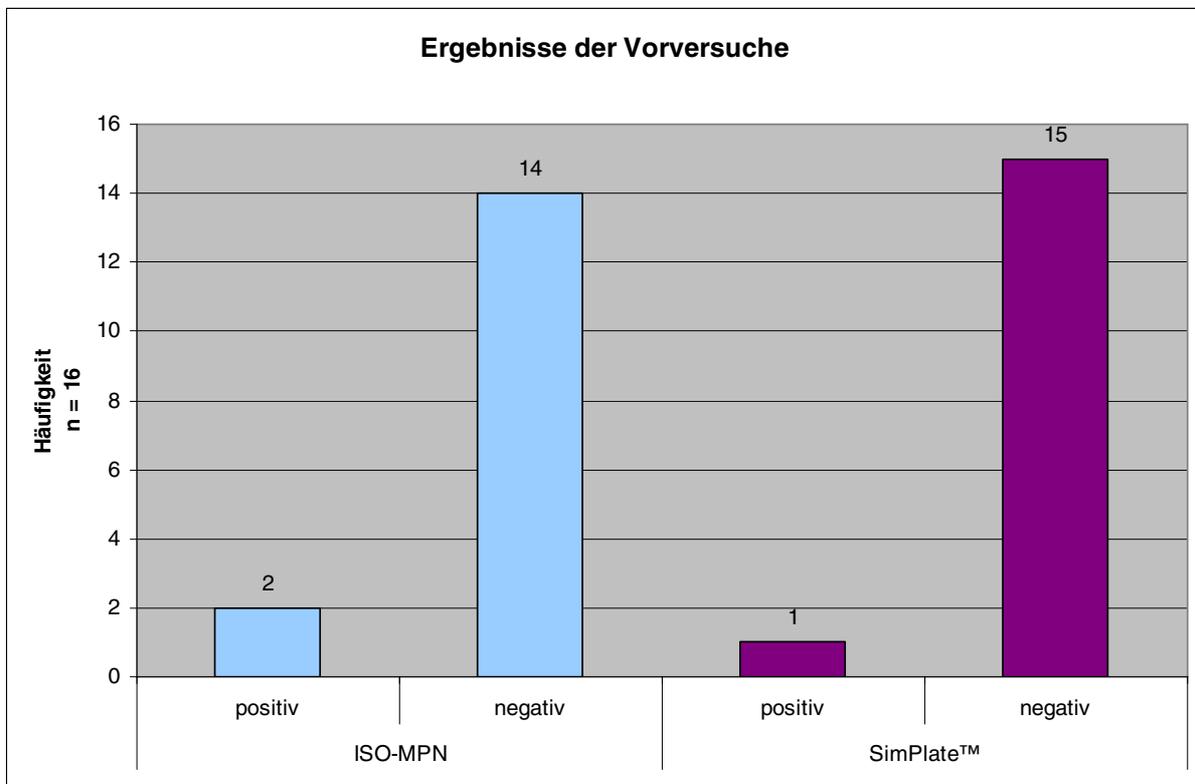


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der positiven und negativen Ergebnisse der Vorversuche

4.3 Hauptversuche

4.3.1 Auswertung der Ergebnisse des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems im Vergleich mit denen der ISO 10272:1995 (E)-Methode im MPN-Verfahren („ISO-MPN“)

In den Hauptversuchen konnten mittels ISO-MPN-Verfahren in 22 von 100 untersuchten Geflügelfleischproben *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden. Dabei wurden bei acht der positiv detektierten Proben *Campylobacter*-Gehalte < 20 KbE/g ermittelt, was einer Kontamination unterhalb des Messbereiches des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems entspricht. Diese Datenpaare wurden bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität nicht berücksichtigt.

Von den 14 verbleibenden positiv detektierten Proben konnten fünf (35,7 %) durch das SimPlate™ Campylobacter CI-System ebenfalls als *Campylobacter* spp.-haltig bestätigt werden. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 35,7 % und eine Spezifität von 100 % (Formel und Berechnung s. Abb. 8). Bezieht man die zwei kontaminierten Proben der Vorversuche in die Berechnung mit ein, so wurden 6 von 16 Proben durch das SimPlate™ Campylobacter CI-System ebenfalls als positiv identifiziert, was die Erfolgsrate und somit die Sensitivität nur unwesentlich auf 37,5 % erhöht.

| | |
|-------------------|------------------|
| n = 100 | |
| $n_{r\ pos} = 5$ | $n_{f\ pos} = 0$ |
| $n_{r\ neg} = 78$ | $n_{f\ neg} = 9$ |

$$\text{Sensitivität} = \frac{n_{r\ pos} \times 100}{n_{r\ pos} + n_{f\ neg}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{n_{r\ neg} \times 100}{n_{r\ neg} + n_{f\ pos}}$$

Sensitivität = 35,7 %

Spezifität = 100 %

Sensitivität

Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis anzuzeigen

Spezifität

Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis anzuzeigen

n = Anzahl der Proben, r pos = richtig positives Ergebnis, f neg = falsch negatives Ergebnis, f pos = falsch positives Ergebnis, r neg = richtig negatives Ergebnis

Abb. 8: Ermittlung der Sensitivität und Spezifität des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems aufgrund der Ergebnisse der Hauptversuche unter Vernachlässigung der Fluoreszenz von roten Kavitäten nach HUMBERT et al. (1989)

Die nach beiden Methoden ermittelten *Campylobacter*-Gehalte zeigten wenig bis keine Korrelation.

Falsch-negative Ergebnisse traten mit dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System auch bei hohen *Campylobacter*-Gehalten auf (s. Tab. 19, Probennummer S58, S57 und S100). Jedoch stieg die Wahrscheinlichkeit einer richtig positiven Detektion durch einen hohen *Campylobacter*-Gehalt (s. Probennummer S62 und S63).

Weil die mittels des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems nachgewiesenen *Campylobacter*-Gehalte stets niedriger lagen als die ISO-MPN-Werte oder dieser Keim in zwei Dritteln der Fälle gar nicht erst detektiert wurde, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass die Bedingungen zur Resus-zitation dieser anspruchsvollen Mikroorganismen suboptimal sind. Untermuert wird diese Aussage durch die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen.

Die Versuchsansätze, bei denen durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System zumindest die Anwesenheit von *Campylobacter* spp. richtig-positiv angezeigt wurde, wenn auch der angezeigte Keimgehalt als zu niedrig gelten musste, lag grundsätzlich *C. jejuni* vor, wenn auch z. T. als Mischkultur. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass die

Detektionsleistung des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems bei dieser Spezies besser ist als beispielsweise bei *C. coli*, weil nie eine *C. coli*-Monokultur nachgewiesen wurde. Ohnehin sind *C. coli*-Kontaminationen bei Geflügelfleisch seltener anzutreffen als solche mit *C. jejuni* (WORKMAN et al., 2005). Allerdings ergab sich bei der Betrachtung der artifiziell kontaminierten Proben, dass die *C. coli*-Stämme im Vergleich zu den *C. jejuni*-Stämmen empfindlicher auf die Lagerung im Kühlschrank reagierten und schneller niedrigere Wachstumsraten zeigten oder sogar überhaupt nicht mehr anzüchtbar waren. Weiterhin entwickelte *C. jejuni* eine kräftigere Rotfärbung bei dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System als *C. coli*. Da eine solche Rotfärbung im Allgemeinen als Nachweis von lebenden Mikroorganismen gilt (CORRY et al., 2003), könnte eine kräftigere Farbausbildung auch auf eine höhere Stoffwechselleistung und somit auch auf eine ausgeprägtere Vitalität hinweisen. Auf Grund dieser Überlegungen ließe sich zwar der Schluss ziehen, dass *C. coli* durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System schwerer nachzuweisen ist (Tab. 22, laufende Nummern 13 bis 21), was dann allerdings für sämtliche kulturellen Verfahren gelten würde. Bei diesem System fällt diese Tatsache aber eher ins Gewicht, da gerade die Resuszipation hier ein großes Problem darstellt.

Es ist auch davon auszugehen, dass sich die geringeren Nachweisraten von *C. coli* nicht nur auf eine niedrigere Prävalenz zurückführen lassen, sondern auch die geringe Widerstandsfähigkeit der Spezies einen wesentlichen Teil dazu beiträgt. So reagiert *C. coli* im Vergleich zu *C. jejuni* empfindlicher auf antimikrobielle Zusätze, die eigentlich gegen die Begleitflora gerichtet sind (BROOKS et al., 1986; CORRY et al., 2003; ENDTZ et al., 1991; NG et al., 1985b; NG et al., 1988). Auch das Singlepath® *Campylobacter* Lateral Flow Assay der Firma Merck wird durch eine geringere Sensitivität gegenüber *C. coli* charakterisiert. Ursächlich dafür könnte wiederum eine nicht ausreichende Resuszipation des Mikroorganismus im vorangehenden kulturellen Anreicherungsschritt sein (JELINEK et al., 2005).

In den 78 Proben, bei denen der *Campylobacter*-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze der ISO 10272:1995 (E)-Methode lag, konnten durch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System ebenfalls keine *Campylobacter* spp. erfasst werden.

Abb. 9 gibt die Positiv- und Negativdetektionen beider durchgeführten Verfahren der Hauptversuche als Säulendiagramm wider. Dabei werden die positiven *Campylobacter* spp.-Nachweise bei der ISO-MPN-Technik zur besseren Vergleichbarkeit zum einen in ihrer Gesamtheit dargestellt und zum anderen in ober- und unterhalb der Nachweisgrenze des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems liegend aufgeteilt.

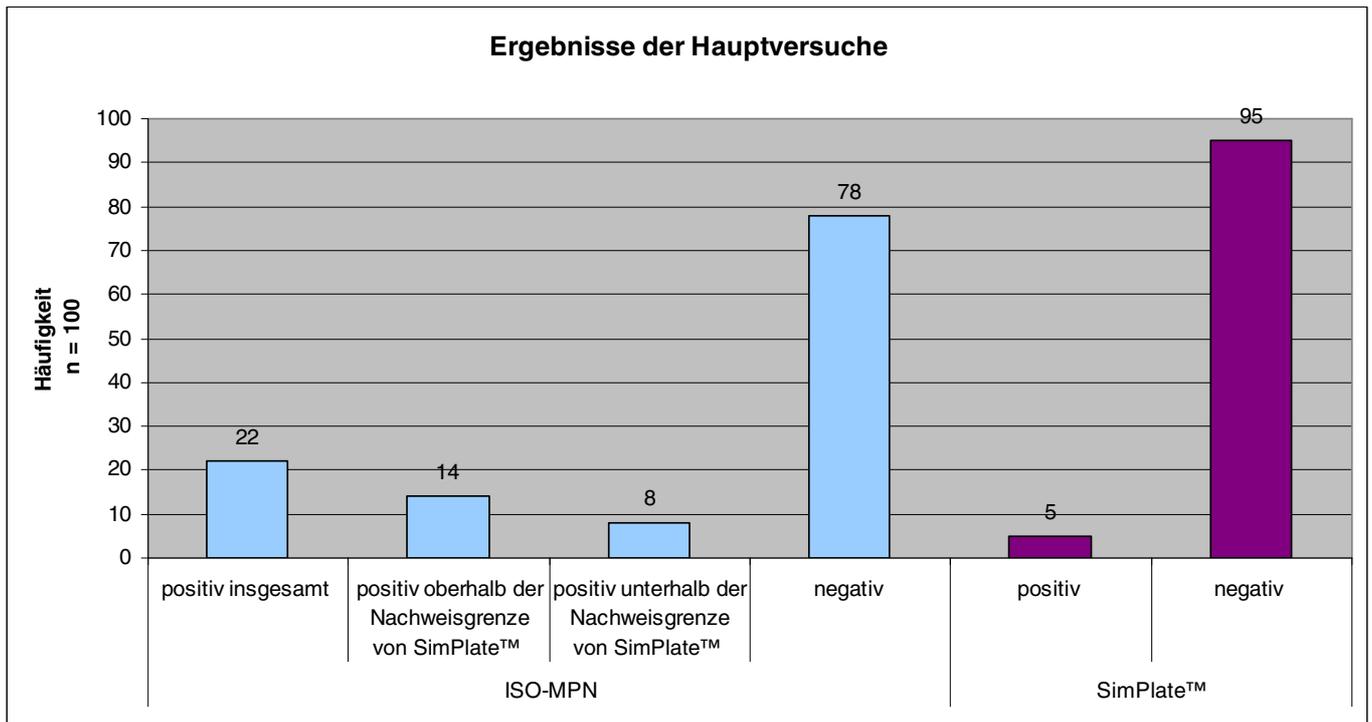


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der positiven und negativen Ergebnisse der Hauptversuche unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems

In Abb. 10 sind die durch das ISO-MPN-Verfahren in den Vor- und Hauptversuchen tatsächlich ermittelten *Campylobacter* spp.-Zahlen gemäß ihrer Häufigkeit als Säulendiagramm dargestellt. Zur besseren optischen Vergleichbarkeit mit den Nachweisen des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems wurden diese Nachweiszahlen in Gruppen zusammengefasst, deren Erfassungsbereiche den erzielten unterschiedlichen *Campylobacter* spp.-Zahlen des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems entsprechen (s. Abb. 12). Letztlich finden sich die tatsächlich mit dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System ermittelten Keimgehalte in Abb. 12.

Den linearen Zusammenhang der positiven *Campylobacter* spp.-Nachweise, wie ihn beide Verfahren erbrachten, gibt Abb. 13 als Regressionsgerade wieder, wobei die ermittelten Keimzahlen des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems auf die y- und die des ISO-MPN-Verfahrens auf die x-Achse aufgetragen wurden. Es ergibt sich eine Korrelation der Verfahren nach Pearson mit einem Koeffizienten von $r = 0,41$, was einen schwachen linearen Zusammenhang anzeigt.

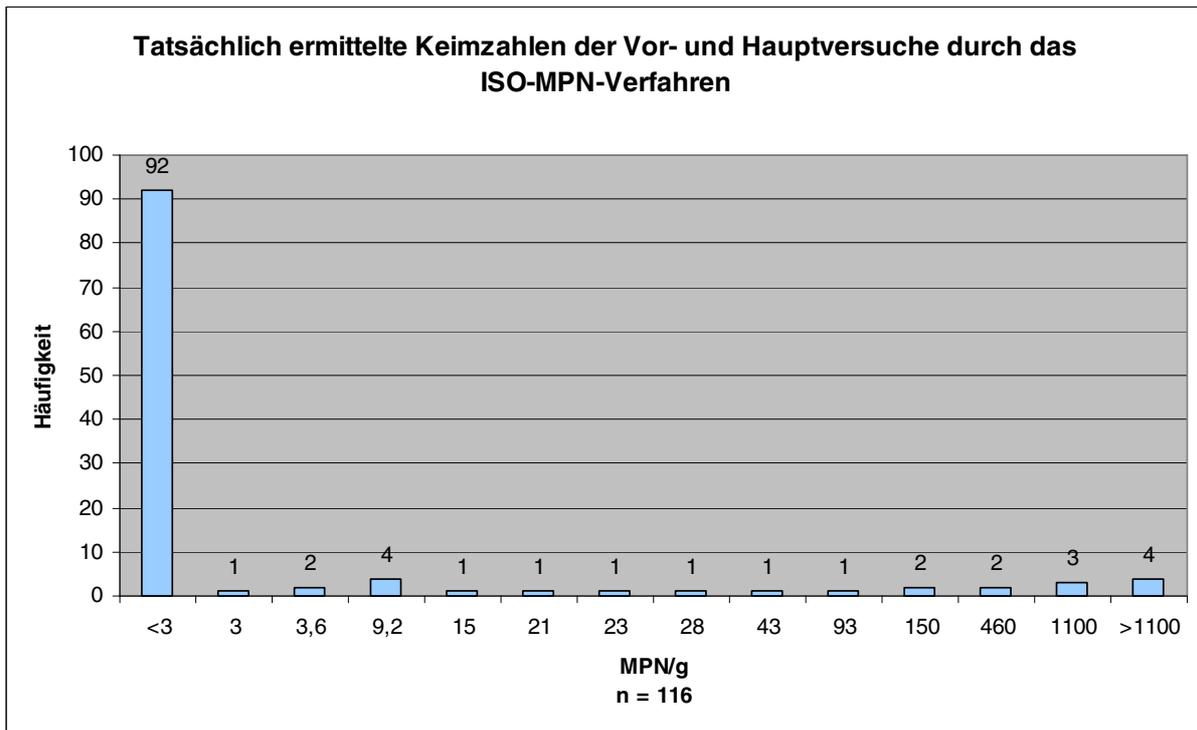


Abb. 10: Durch das ISO-MPN-Verfahren tatsächlich ermittelte *Campylobacter* spp.-Zahlen der Vor- und Hauptversuche zusammengefasst

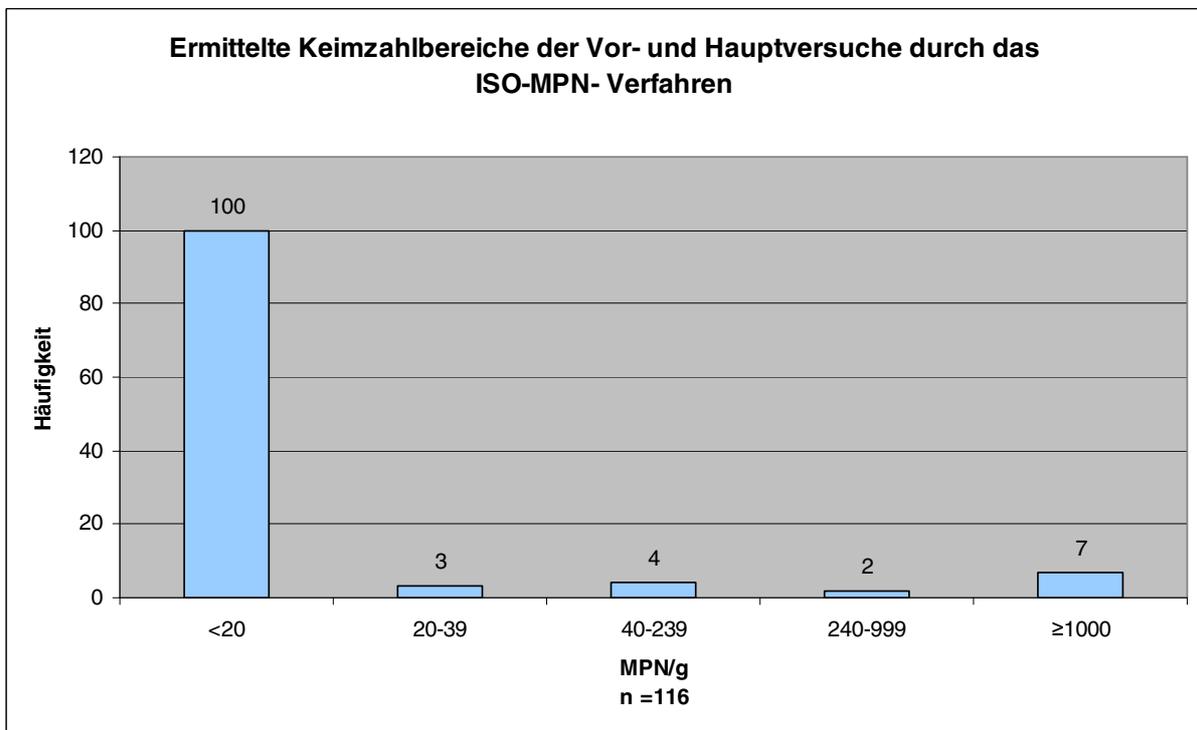


Abb. 11: Einteilung der durch das ISO-MPN-Verfahren ermittelten *Campylobacter* spp.-Zahlen in Keimzahlbereiche, die sich zur besseren Vergleichbarkeit an den durch das SimPlate™-Verfahren erfassbaren Keimzahlbereichen orientieren

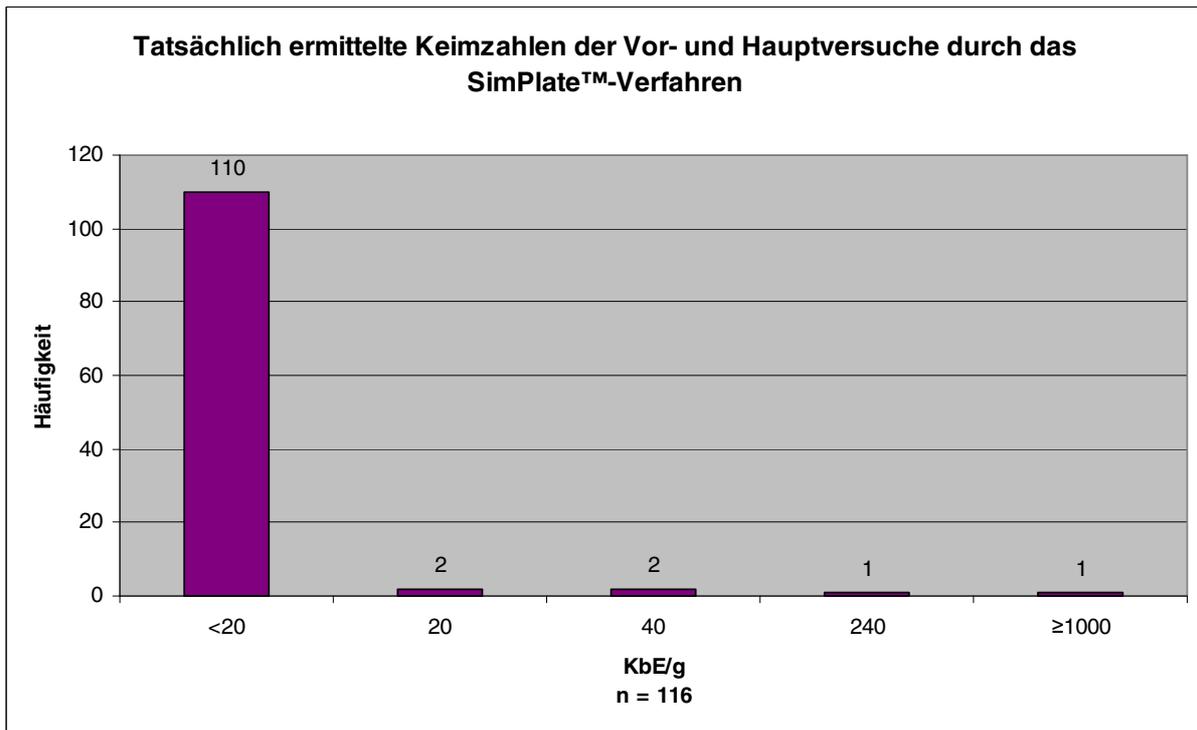


Abb. 12: Durch das SimPlate™-Verfahren tatsächlich ermittelte *Campylobacter* spp.-Zahlen

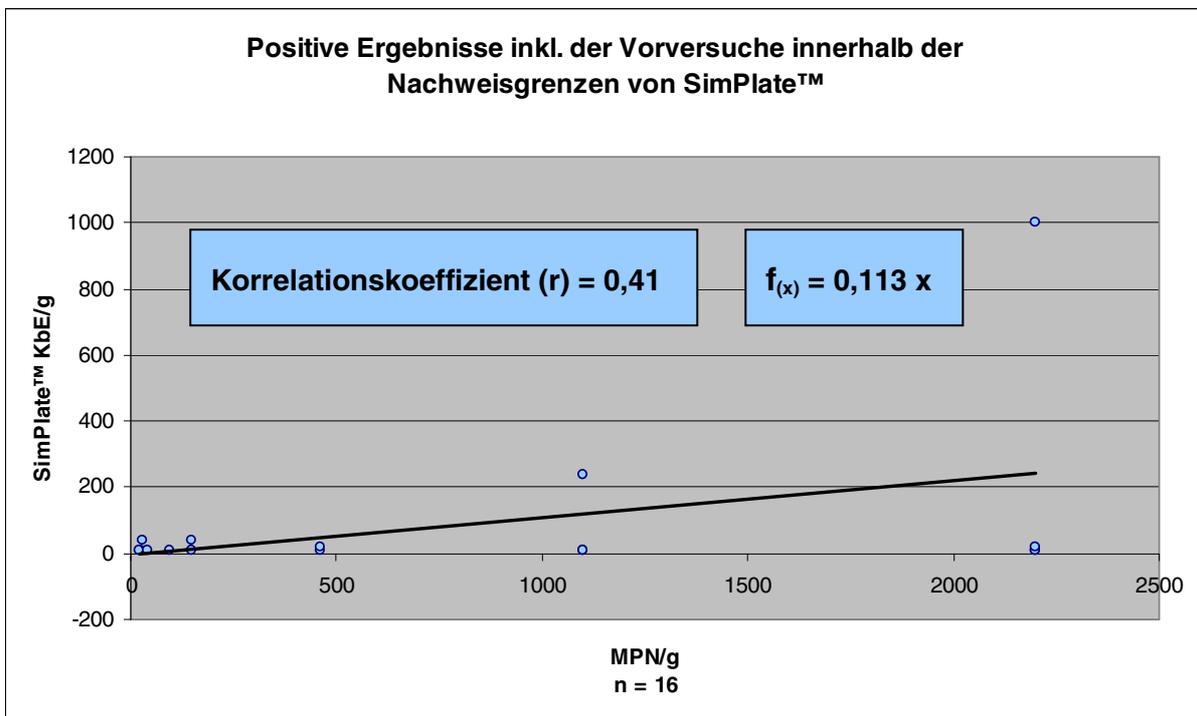


Abb. 13: Regressionsgerade für die Positivnachweise von *Campylobacter* spp. der Vor- und Hauptversuche durch die ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren

4.3.2 Auswertung der artifiziell kontaminierten Versuchsansätze und der Negativkontrollen

Für jeden Probendurchgang des Hauptversuchs wurden eine Negativ- und vier Positivkontrollen mitgeführt, letztere in Form von mit *Campylobacter jejuni* (DSM-Nr. 4688) sowie *Campylobacter coli* (DSM-Nr. 4689) inokuliertem Geflügelfleisch sowie für beide Spezies ohne die Verwendung von Geflügelfleisch.

Bei der Anwendung der Probenaufbereitungsmethode nach Gewinnungsverfahren A, d. h. einschließlich eines Homogenisierungsschrittes (s. 3.8.1), zeigte sich – wie auch gelegentlich bei der Untersuchung des eigentlichen Probenmaterials in den ersten beiden Untersuchungszyklen – eine so starke Eigenfluoreszenz der eingesetzten Probenmatrix, dass es teilweise zu falsch-negativen Ergebnissen kam. Auch die sterile Filtration der Erstverdünnung verbesserte diese Situation nicht wesentlich. Durch die Anwendung der Probenaufbereitungsmethode B konnte die Eigenfluoreszenz derart reduziert werden, dass trotz gelegentlich auftretender, aber zu ignorierender schwacher Fluoreszenzen eine zweifelsfreie Bewertung möglich war (BIOCONTROL, 2002). Wird dieser Aspekt der Eigenfluoreszenz der Probenmatrix außer Acht gelassen, da er nur bei starker Zerkleinerung des Probenmaterials zu falsch-negativen Ergebnissen führt und dies bei einer Routinelaboruntersuchung, mit Ausnahme der Untersuchung von Geflügelhackfleisch, nicht auftreten wird, so erbrachten alle artifiziell kontaminierten Versuchsansätze richtig-positive Resultate.

Allerdings waren trotz der Verwendung der grobsinnlich immer gleichen, zur Kontamination reichlichen Menge an *Campylobacter* spp.-Koloniematerial nicht alle Kavitäten des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems rot gefärbt oder färbten sich nur schwach an (Nr. 13, 15 und 16 des Positivkontrollen-Ansatzes ohne Geflügelfleisch [s. Tab. 21] und Nr. 15 bis 22 des Positivkontrollenansatzes mit Geflügelfleisch [s. Tab. 22]). In dem Zeitraum dieser Untersuchungszyklen wurden *Campylobacter* spp.-Stämme verwendet, die bereits über mehrere Wochen bei Kühltemperaturen gelagert worden waren. Ab den laufenden Nummern 17 (Positivkontrollen-Ansatz ohne Geflügelfleisch; s. Tab. 21) bzw. 23 (Positivkontrollen-Ansatz mit Geflügelfleisch; s. Tab. 22) sind wieder frisch angezüchtete *Campylobacter* spp.-Stämme verwendet worden. Es wurde dann im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführungen darauf geachtet, dass die verwendeten Stämme zur Positivkontrolle nicht älter als zwei Wochen waren. Nunmehr ließ sich, wie zu Beginn der Versuchsreihe, wieder eine Rotfärbung aller Kavitäten beobachten. Im Gegensatz dazu waren bei den Positivkontrollen nach dem Verfahren der ISO 10272:1995 (E) keine Veränderungen bei der Anzucht, wie geringere Koloniegroße oder schwächere Ausprägung der biochemischen Eigenschaften, gegenüber den vorherigen Versuchszyklen feststellbar. Dieser Befund gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass mit dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System die Gefahr steigt, falsch-negative Ergebnisse bzw. quantitativ zu niedrige Keimzahlen zu erhalten, sobald es sich um subletal geschädigte *C. jejuni* und *C. coli* im Probenmaterial handelt, obwohl nach ausreichender Resuszipation durchaus Vermehrungsfähigkeit unterstellt werden durfte.

Auch kann festgestellt werden, dass im Fall der Verwendung von frischem Koloniematerial zur Durchführung einer Positivkontrolle stets ein sicherer Nachweis stattgefunden hat. Weil die *Campylobacter*-Zahl des zur Inokulation verwendeten Koloniematerials unbekannt war, verbietet sich eine quantitative Bewertung.

Falsch-positive Ergebnisse wurden – wie auch bei der Untersuchung des eigentlichen Probenmaterials – in keinem Untersuchungszyklus festgestellt.

In Abb. 14 bzw. Abb. 15 werden die Ergebnisse der durchgeführten Positivkontrollen mit bzw. ohne die Verwendung von Geflügelfleisch als Säulendiagramme dargestellt. Es zeigt sich, dass bei der Verwendung von Geflügelfleisch das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System häufiger falsch-negative Ergebnisse erbringt als bei reinen Nährlösungen. Offenbar wirkt Geflügelfleisch an sich, wahrscheinlich die darin befindliche Begleitflora, zusätzlich hemmend auf *Campylobacter* spp. und erschwert so zusätzlich eine Anzucht.

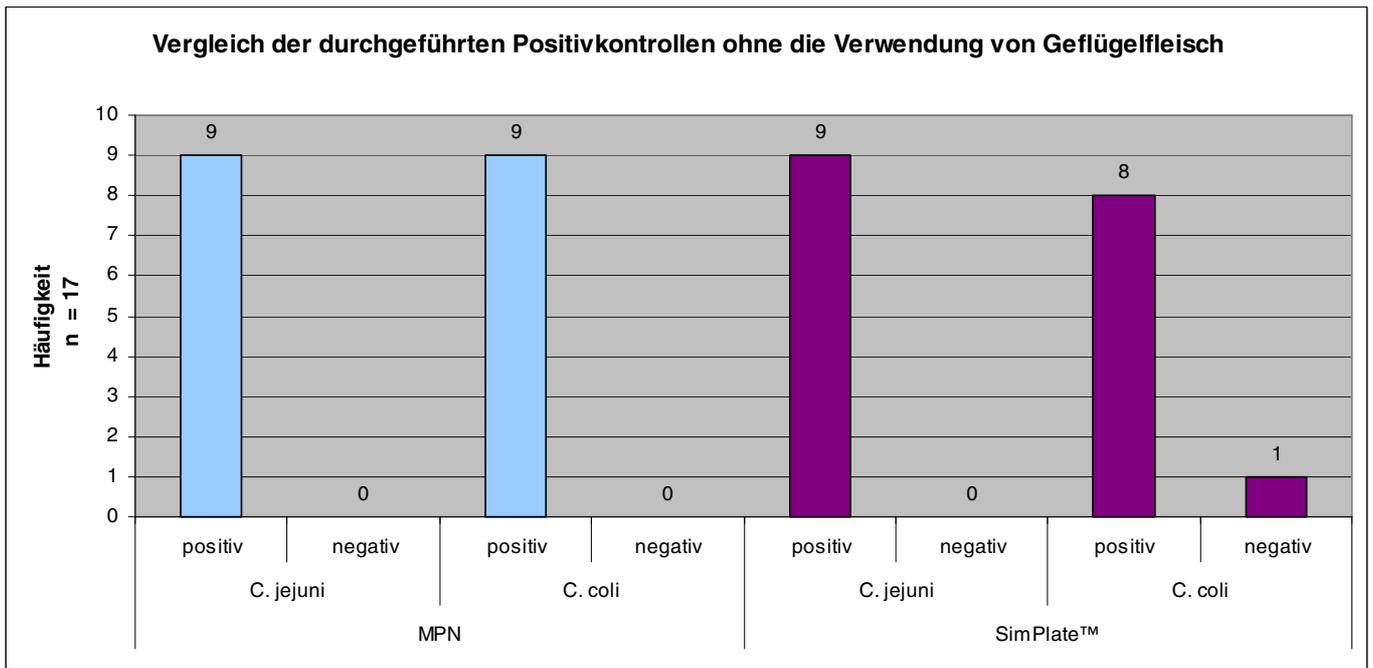


Abb. 14: Ergebnisse der mit ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Positivkontrollen ohne Verwendung von Geflügelfleisch

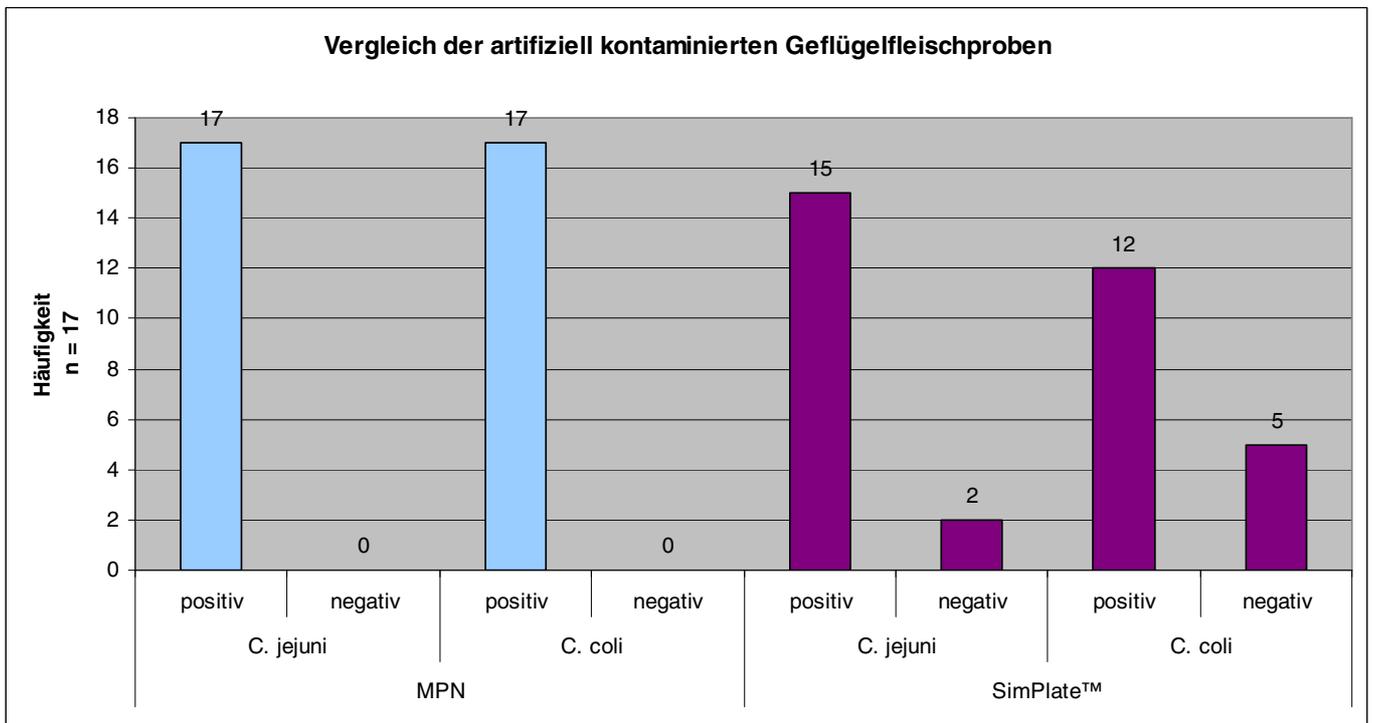


Abb. 15: Ergebnisse der mit ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Positivkontrollen unter der Verwendung von Geflügelfleisch

Bei den durchgeführten Negativkontrollen traten beim SimPlate™ Campylobacter CI-System keine falsch-positiven Ergebnisse (s. Abb. 16 und Tab. 23) auf, was sich auch in dem erzielten Wert für die Spezifität widerspiegelt.

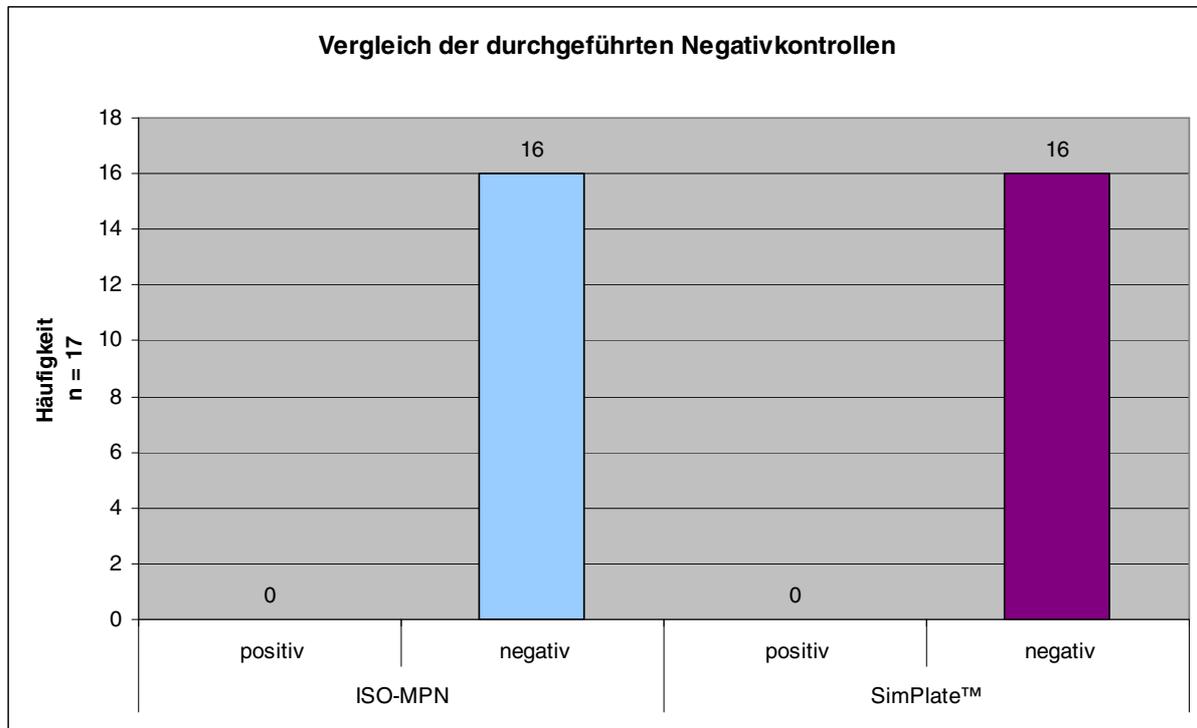
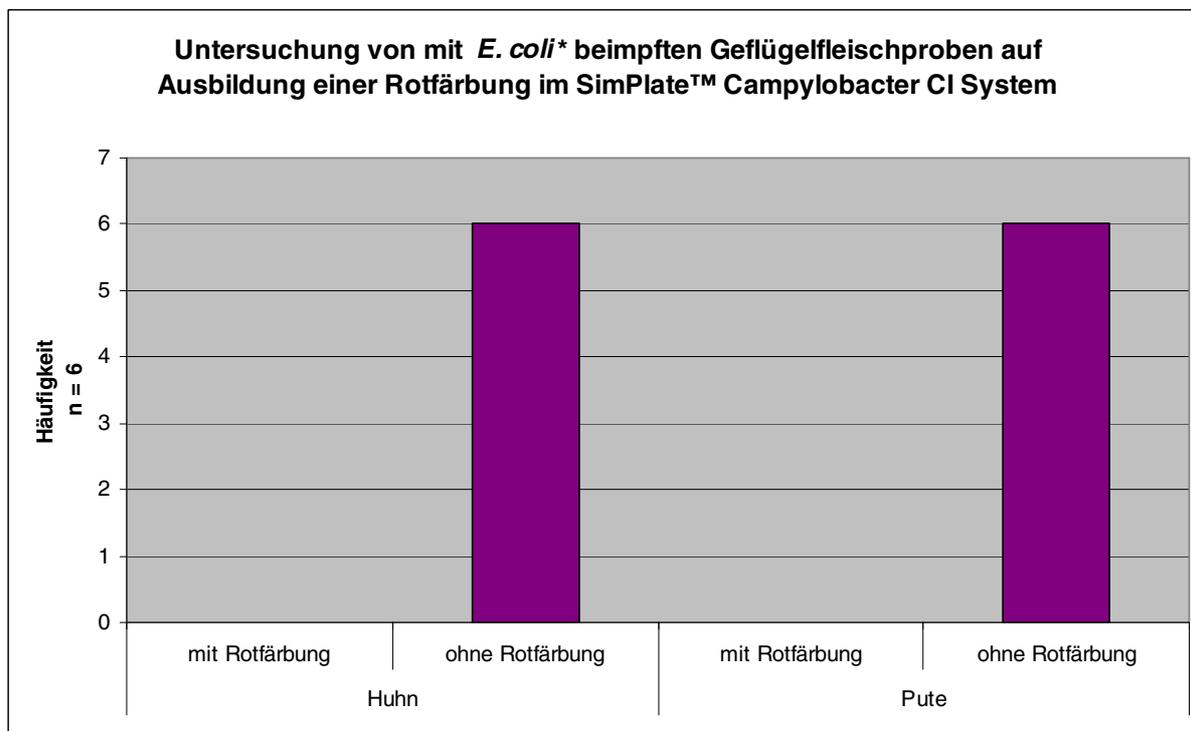


Abb. 16: Ergebnisse der mit ISO-MPN- und SimPlate™-Verfahren durchgeführten Negativkontrollen

4.3.3 Untersuchung dreier *E. coli*-Stämme mit Hilfe des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems

Da auch einige *E. coli*-Stämme eine TTC-Reduktion bewirken sollen, wurden drei Isolate auf eine entsprechende Reaktion überprüft (vgl. 3.8.6). In keinem Fall kam es zu einer Rotfärbung der Kavitäten des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems (s. Abb. 17 und im Anhang Tab. 24). Konkreter Anlass für die Überprüfung war, dass bei einem einmalig durchgeführten Versuch die Kavität einer eigentlich als Negativkontrolle verwendeten Platte eine Rotfärbung zeigte und zwar nach direkter Beimpfung mit Material einer ganzen Kolonie des auch in der Reihe überprüften laboreigenen *E. coli*-Stammes. Solche Ausreißer können in seltenen Fällen auftreten, da eine Rotfärbung der Kavitäten durch andere Mikroorganismen als *Campylobacter* spp. in ca. 2 % der Fälle möglich ist. Die Wahrscheinlichkeit, einen solchen Stamm zufälligerweise in der laboreigenen Sammlung des Instituts für Lebensmittelhygiene zu haben, fällt sehr gering aus. Leider konnte durch die vertreibende Firma nicht in Erfahrung gebracht werden, welche Gruppe von *E. coli*-Stämmen unter den geforderten Wachstumsbedingungen eine Rotfärbung mit Fluoreszenz verursacht. Die Verwendung eines solchen Bakteriums als Positivkontrolle zur Überprüfung der

Fluoreszenz und somit zur Unterscheidung von der Eigenfluoreszenz der Untersuchungsmatrix wäre wünschenswert und hilfreich bei der Auswertung des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems gewesen.



* folgende *E.coli*-Stämme wurden jeweils im Doppelansatz überprüft: *E. coli* (laborspezifisch), *E. coli* DSM 1103 und *E. coli* DSM 30083

Abb. 17: Ergebnisse aus der Überprüfung dreier *E. coli*-Stämme auf die Ausbildung einer roten Farbreaktion im SimPlate™ Campylobacter CI-System

4.3.4 Speziesdifferenzierung

Mit Hilfe der ISO 10272:1995 (E)-Methode einschließlich der speziestypischen Charakteristika (s. Tab. 3/S. 34) wurde 12 x *C. jejuni* (54,5 %), 3 x *C. coli* (13,6 %), 1 x *C. lari* (4,5 %) und in 6 Fällen (27,3 %) eine Mischkultur nachgewiesen. Die Speziesdifferenzierung durch die PCR-Untersuchung ergab 16 x *C. jejuni* (72,7 %), 1 x *C. coli* (4,5 %) und 5 x eine Mischkultur (22,7 %). Aufgegliedert nach den einzelnen Proben finden sich diese Resultate in Tab. 19 des Anhangs.

In Tab. 15 sind die positiven Proben nach den beiden Verfahren getrennt einander gegenübergestellt. In 46 % der Fälle stimmte die ermittelte Spezies nicht oder, wie bei den Mischkulturen, nicht vollständig überein. Die Bestimmung von anderen *Campylobacter* spp. als *C. jejuni* und *C. coli* wäre bei der PCR durch das Protokoll von WANG et al. (2002) möglich gewesen, jedoch wurden hier lediglich Primer gegen Gene für *C. jejuni* und *C. coli* verwendet. Die Anwesenheit anderer *Campylobacter* spp. wird nur unspezifisch durch die interne

Positivkontrolle über die 23S-rDNS angezeigt. Daher stehen die Nachweise von *C. lari* und *C. upsaliensis* durch die ISO 10272:1995 (E)-Methode nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der PCR-Untersuchung, weil die interne Positivkontrolle bei jeder der durch die ISO 10272:1995 (E)-Methode positiv getesteten Kolonien reagiert hat. So ist es möglich, dass durch das PCR-Protokoll nur *C. jejuni* oder *C. coli* angezeigt wird, jedoch eine Mischkultur mit einer anderen *Campylobacter* spp. als den beiden genannten vorliegt.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Speziesidentifizierung nach PCR und ISO 10272:1995 (E)-Methode könnte weiterhin auch daher rühren, dass bei der zufälligen Auswahl des Koloniematerials (fünf verdächtige Kolonien vom PRESTON- bzw. KARMALI-Agar), andere Spezies bei der ISO 10272:1995 (E)-Methode zur Untersuchung gelangten als bei der PCR-Analyse. Für erstere gelangten nicht die Reinkulturen aus den fünf zufällig ausgewählten Kolonien zur Untersuchung, sondern nicht mehr kultivierbares Koloniematerial von gekühlt aufbewahrten PRESTON- und KARMALI-Nährböden. Hiervon waren die fünf verdächtigen Kolonien für die ISO 10272:1995 (E)-Untersuchung zuvor bereits entnommen worden. Als weitere Ursache für Ungenauigkeiten bei der Ermittlung der Spezies durch das kulturelle Verfahren kommen Probleme bei der Anzucht des Mikroorganismus, beispielsweise bei der Überprüfung der Antibiotikaresistenz, in Betracht.

Tab. 15: Speziesidentifizierung mittels ISO 10272:1995 (E)-Methode und PCR: Vergleich

| Spezies | | |
|---------|--|-----------------------------------|
| ISO | ISO 10272:1995 (E) | PCR |
| S 29 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 30 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 33 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| S 35 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 39 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 41 | <i>C. jejuni / C. coli / C. lari</i> | <i>C. jejuni / C. coli</i> |
| S 42 | <i>C. coli / C. lari</i> | <i>C. jejuni / C. coli</i> |
| S 57 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 58 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 62 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 63 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 64 | <i>C. jejuni / C. coli.</i> | <i>C. jejuni / C. coli.</i> |
| S 65 | <i>C. jejuni / C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 66 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni / C. coli</i> |
| S 68 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 72 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. spp.</i> |
| S 73 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 84 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 89 | <i>C. lari</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 90 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 92 | <i>C. jejuni / C. coli / C. upsaliensis</i> | <i>C. jejuni</i> |
| S 100 | <i>C. jejuni / C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> |

Abweichende Ergebnisse werden in Fettdruck dargestellt.



Abb. 18: PCR-Untersuchungsergebnisse von Koloniematerial der durch die ISO 10272:1995 positiv getesteten Proben

Abb. 18 zeigt die PCR-Untersuchungsergebnisse von Koloniematerial, das beim kulturellen Verfahren gemäß ISO 10272:1995 (E) im Hauptversuch (S1–S100) positive Resultate erbrachte. Die Zahlen in der vierten Zeile geben die in der Multiplex-PCR vergebenen Probennummern an. Aus organisatorischen Gründen entsprechen sie nicht den in den Ergebnistabellen der Hauptversuche verwendeten Probennummern. Die Zuordnungen sind Tab. 19 des Anhangs zu entnehmen.

Banden in der Zeile, die mit „23S“ benannt ist, zeigen einen positiven Nachweis von *Campylobacteraceae* über die 23S-rDNS an. Finden sich Banden in den Zeilen „Cj“ bzw. „Cc“, so wurde *C. jejuni* bzw. *C. coli* detektiert. Bei den Spalten „Cj“ bzw. „Cc“ handelt es sich jeweils um die mitgeführte Positivkontrolle von *C. jejuni* bzw. *C. coli*. Die Spalte Ab bzw. Vp stellt die mitgeführten Negativkontrollen dar, wofür *Arcobacter butzleri* bzw. *Vibrio parahaemolyticus* verwendet wurden.

5 Schlussfolgerungen

Prinzipiell handelt es sich bei dem SimPlate™ *Campylobacter* CI-System um ein schnelles, einfach anwendbares, qualitatives und quantitatives Nachweisverfahren von lebenden thermophilen *Campylobacter* spp.. Gegenüber einigen anderen Schnelltests besteht der Vorteil im Erfassen vermehrungsfähiger Mikroorganismen, was prinzipiell weiterführende kulturelle Untersuchungen zur Speziesdifferenzierung gestattet. Der labortechnische Aufwand ist vergleichsweise gering, die Kosten für die Durchführung sind niedrig, und es zeigte sich in der Versuchsreihe eine sehr gute Spezifität von 100 %. Auf der anderen Seite traten falsch-negative Resultate in natürlich kontaminierten Proben mit inakzeptabler Häufigkeit auf (Sensitivität 37,5 %), auch wenn der qualitative Nachweis aus künstlich kontaminiertem, nicht homogenisiertem Probenmaterial (Positivkontrollen) in allen Fällen möglich war.

Beim quantitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. konnte nur eine geringgradige bis gar keine Übereinstimmung mit der Referenzmethode ISO festgestellt werden. Hierfür war nicht nur die höhere Nachweisschwelle des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems verantwortlich, sondern es wurden auch Gehalte nicht erfasst, die gemäß Referenzmethode oberhalb des Detektionslimits lagen.

Aufgrund der geringen Sensitivität eignet sich das System nicht für die praktische Anwendung. Dieser Mangel liegt in erster Linie an einer ungenügenden Resuszipitation der gesuchten Mikroorganismen. Die Lösung in Form einer längeren Bebrütungszeit verbietet sich von vorneherein, weil die Methode als Schnelltest ausgelegt ist. Deshalb ist es auch nicht relevant, ob mit einer Optimierung der Zusammensetzung von Nährmedium und antimikrobiellen Substanzen zur Unterdrückung der Begleitflora oder auch einer Anpassung im Bereich der Bebrütungstemperatur weitere Verbesserungen erzielt werden können.

Erwähnung verdient auch die Eigenfluoreszenz der Matrix und die daraus resultierenden Unsicherheiten bei der Ergebnisinterpretation. Dieses Phänomen läßt sich in praxi bei der Untersuchung von stark zerkleinerten Geflügelfleischproben, vor allem bei der Mitverwendung der Haut, kaum verhindern. Bei der Verwendung von reinen Spülwasserproben könnte die Eigenfluoreszenz auf ein akzeptables Maß reduziert werden. Auch die Verwendung vom Knochen gelöster Fleischabschnitte mit Haut ohne anschließende Feinzerkleinerung verursachte keine nennenswerte Eigenfluoreszenz.

Die hohen Ansprüche bei der Kultivierung, kombiniert mit einer relativ geringen Tenazität von *Campylobacter* spp., stellen seit Entdeckung des Mikroorganismus eine große Herausforderung dar. Ein optimales Nachweisverfahren konnte bislang nicht gefunden werden. Auch in Zukunft wird jede der entwickelten zahlreichen Kultivierungs- und Nachweismethoden Abstriche in irgendeinem Bereich – sei es Zeit, Labor- und/oder Kostenaufwand, Sensitivität oder Spezifität – machen müssen. Die Frage ist, in welchem Punkt dies für den jeweiligen Anwendungsbereich akzeptabel ist.

6 Zusammenfassung

Die Eignung des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems als Schnelltest für *Campylobacter* spp. wurde im Vergleich mit dem ISO-MPN-Verfahren gemäß ISO 10272:1995(E) überprüft. Als Untersuchungsmaterial dienten insgesamt (Vor- und Hauptversuche) 116 Proben Puten- und Hähnchenfleisch. Während mit dem Standardverfahren 24 positive Ergebnisse erzielt wurden, waren es mit dem Schnelltest lediglich sechs, was zum Teil an der hohen Nachweisschwelle lag.

Für die mittels ISO isolierten *Campylobacter*-Stämme wurde eine phänotypische und eine molekularbiologische (PCR) Speziesidentifizierung durchgeführt. In 46 % der Fälle stimmte die Zuordnung der Arten nicht bzw. bei Mischkulturen lediglich teilweise überein.

Für eine differenzierte Beurteilung des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems sind folgende Punkte maßgeblich:

- Das SimPlate™ *Campylobacter* CI-System zeigte im Verlauf dieser Versuchsreihe (Vor- und Hauptversuche) eine Sensitivität von 37,5 % bei natürlich kontaminierten gekühlten Geflügelfleischproben. Die Sensitivität bei mit frischem Koloniematerial artifiziell inokuliertem Probenmaterial lag dagegen bei 100 %. Die Ursache der für den praktischen Laborgebrauch inakzeptabel geringen Sensitivität bildet vermutlich eine nicht ausreichende Resuszipitation des Zielkeimes. Auch eine Hemmung von *Campylobacter* spp. durch Bestandteile der Rezeptur kommt in Betracht.
- Die Spezifität des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems lag bei 100 %. Dieses gute Ergebnis kompensiert aber nicht die geringe Sensitivität.
- Eine Verlängerung der Inkubationszeit könnte die Sensitivität des SimPlate™ *Campylobacter* CI-Systems verbessern, steht aber im Widerspruch zur Auslobung als Schnelltest.
- Relevante Probleme bei der Beurteilung der Fluoreszenz der Kavitäten treten nur bei zerkleinertem Probenmaterial auf, könnten aber bei der Untersuchung von Geflügelhackfleisch durchaus zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
- Bei einer Inokulation mit 10^3 KbE/ ml erzeugten die drei überprüften *E. coli*-Stämme keine Rotfärbung der Kavitäten der SimPlate™ *Campylobacter* CI-System-Platten. Lediglich ein direktes Beimpfen einer Kavität mit Koloniematerial in großer Menge erzeugte diese Reaktion. Aufgrund der nicht selten vorkommenden Eigenfluoreszenz der Probenmatrix wäre es durchaus hilfreich, einen *E. coli*-Stamm als Positivkontrolle der Fluoreszenz mitzuführen, der gleichzeitig eine verdächtige Rotfärbung der Kavitäten auslöst. Zu diesem Zweck wären weitere *E. coli*-Stämme zu überprüfen bzw. müsste der Hersteller entsprechende Stämme benennen, um die Auswertbarkeit des Testkits zu verbessern.

- Die Sensitivität des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems scheint für *C. jejuni* höher als für *C. coli* zu sein; ein Umstand, der wegen der geringeren Tenazität von *C. coli* für alle vollständig oder teilweise kulturellen Verfahren gelten dürfte.

7 Summary

Comparison of the SimPlate™ Campylobacter CI-System with the cultural standard method for the detection of *Campylobacter* spp.

The suitability of the SimPlate™ Campylobacter CI-System as a rapid test for *Campylobacter* spp. detection was investigated in comparison with the ISO-MPN-method as stipulated in ISO 10272:1995(E). 116 turkey and chicken meat samples were used for both, preliminary and main experiments. With the ISO-MPN-method system 24 out of 116 meat samples were identified as *Campylobacter* positive whereas SimPlate™ detected only 6 *Campylobacter*-positive samples, partly reasoned by the high detection limit of this system. The 24 *Campylobacter* strains from the ISO-MPN isolation were characterised on the phenotypical and molecular level. However, 46 % of all assignments did not match, or only particular matches were found in mixed cultures, respectively.

The following issues represent major benchmarks for the differentiated evaluation of the SimPlate™ Campylobacter CI-System:

- The SimPlate™ Campylobacter CI-system showed a 100 % sensitivity when it was used with artificially contaminated samples. In contrast, the sensitivity decreased to 37.5 % when naturally contaminated chilled samples of poultry meat were tested. It is reasonable to assume that, in view of the unacceptable low sensitivity, the resuscitation of the microorganism was not sufficient. Furthermore, a growth inhibition of *Campylobacter* spp. caused by individual formula ingredients has to be taken into account.
- No false positive samples were detected with the SimPlate™ Campylobacter CI-system. However, a high specificity does not compensate the lack of sensitivity.
- A prolonged incubation period could improve the sensitivity of the SimPlate™ Campylobacter CI-system but this would contradict the presumed time-related advantages of the system.
- Relevant problems with the evaluation of the fluorescence of the cavities arise when chopped sample material is used. This may cause wrong negative results when minced poultry meat is used for testing.
- No red staining of the SimPlate™ cavities was observed when 10^3 CFU/ ml suspensions of the three tested *E. coli* strains were inoculated. Only direct inoculation with undiluted colony material induced a reaction. It would be helpful in this context to use an *E. coli* strain for positive control, because the observed red staining of the cavities would allow a differentiation from unspecific, sample material caused fluorescence signals. However, the use of different *E. coli* strains should be examined in the future in order to help the manufacturer to improve the application of its product.

- The results suggest that the The SimPlate™ Campylobacter CI-system has a higher sensitivity for *C. jejuni* detection in comparison with *C. coli*. This fact should also be assumed for other cultural based detection systems as a result of the lower tenacity of *C. coli*.

8 Literaturverzeichnis

- ABRAM, D. D., und N. N. POTTER (1984)
Survival of *Campylobacter jejuni* at different temperatures in broth, beef, chicken and cod supplemented with sodium-chloride
Journal of Food Protection, **47** (10), 795–800
- ALTER, TH. (2011)
Molekularbiologische Detektion, Speziesdifferenzierung und Typisierung
Persönliche Kommunikation; 16.03.2011, 07:30 Uhr
- ALTER, TH., A. BORI, A. HAMED, L. ELLERBROEK und K. FEHLHABER (2006)
Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of *Campylobacter jejuni* in German style fermented turkey sausages
Food Microbiology, **23** (7), 701–707
- ALTER, TH., R. M. WEBER, A. HAMEDY und G. GLUNDER (2011)
Carry-over of thermophilic *Campylobacter* spp. between sequential and adjacent poultry flocks
Veterinary Microbiology, **147** (1–2), 90–95
- BASERISALEHI, M., N. BAHADOR und B. P. KAPADNIS (2006)
Effect of heat and food preservatives on survival of thermophilic *Campylobacter* isolates in food products
Research Journal of Microbiology, **6**, 512–519
- BAUMGART, J. (2004)
Bestimmung der Keimzahl
In: Baumgart, J. und B. Becker (Hrsg.) Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. B. Behrs Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 5. Auflage, pp. 120–123
- BHAVSAR, S. P., M. BASERISALEHI und B. P. KAPADNIS (2004)
Effect of gamma radiation on survival of campylobacters in various food samples
Indian Journal of Medical Microbiology, **22** (1), 39–43
- BIOCONTROL (2002)
SimPlate™ *Campylobacter* Color Indicator System
In: Instruction Sheet. BioControl Systems, Inc.
- BLASER, M. J., und J. ENGBERG (2008)
Clinical Aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Infections
In: Nachamkin, I., Szymanski, C. M., und Blaser, M. J. (eds.) *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, 3rd edition, pp. 99–121

- BLASER, M. J., F. M. LAFORCE, N. A. WILSON und W. L. WANG (1980)
Reservoirs for human campylobacteriosis
Journal of Infectious Diseases, **141** (5), 665–669
- BLASER, M. J., D. N. TAYLOR und R. A. FELDMAN (1983)
Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections
Epidemiologic Reviews, **5**, 157–176
- BOLTON, F. J., und D. COATES (1983)
Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance
Journal of Applied Bacteriology, **54** (1), 115–125
- BOLTON, F. J., und L. ROBERTSON (1982)
A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*
Journal of Clinical Pathology, **35** (4), 462–467
- BROOKS, B. W., M. M. GARCIA, A. D. E. FRAZER, H. LIOR, R. B. STEWART und A. M. LAMMERDING (1986)
Isolation and characterisation of cephalothin-susceptible *Campylobacter coli* from slaughtered cattle
Journal of Clinical Microbiology, **24**, 585–586
- BRUCE, D., W. ZOCHOWSKI und G. A. FLEMING (1980)
Campylobacter infections in cats and dogs
Veterinary Record, **107** (9), 200–201
- BUBERT, A., L. THOMPSON, C. LINDHARDT und H.-G. LEUSCH (2004)
Singlepath® *Campylobacter* Lateral Flow Assay als einfache Methode zur Identifizierung von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln
In: 23. Jenaer Symposium: *Campylobacter*-Infektionen, Jena, 1.-2. Juli 2004
- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL) (1991)
Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der coliformen Keime in Milch, Milchprodukten, Butter, Käse und Speiseeis. Verfahren mit flüssigem Nährmedium
In: L 01.00-2, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Berlin, Beuth Verlag GmbH
- BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (BVL) (2007)
Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln, L 00.00-107, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Berlin, Beuth Verlag GmbH
- BUTZLER, J. P., P. DEKEYSER und M. E. A. DETRAIN (1973)
Related *Vibrio* in stools
Journal of Pediatrics, **82**, 493

- BUTZLER, J. P., und J. OOSTEROM (1991)
Campylobacter: pathogenicity and significance in foods
International Journal of Food Microbiology, **12**, (1), 1–8
- CANAHAM, A. S. (1948)
Vibrio foetus infection in cattle
Journal of the South African Veterinary Medical Association, **19**, 103–104
- CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH (2005)
Factsheet: Campylobacteriosis
College of Veterinary Medicine, Iowa State University, pp. 1–5
- CHÂTRE, P., M. HAENNI, D. MEUNIER, M. A. BOTREL, D. CALAVAS und J. Y. MADEC (2010)
Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from cattle between 2002 and 2006 in France
Journal of Food Protection, **73** (5), 825–831
- COOPER, I. A., und K. J. SLEE (1971)
Human infection by *Vibrio fetus*
The Medical Journal of Australia, **1**, 1263
- CORRY, J. E. L., H. I. ATABAY, S. J. FORSYTHE und L. P. MANSFIELD (2003)
Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters
In: CORRY, J. E. L., G. D. W. CURTIS und R. M. BAIRD (eds.) Handbook of Culture Media for Food Microbiology. Elsevier Science B. V., Amsterdam, Vol 37, pp. 271–316
- CURTIS, A. H. (1913)
A motile, curved, anaerobic bacillus in uterine discharges
Journal of Infectious Diseases, **12**, 165–169
- DAVIS, C. (2005)
Introduction to Immunoassay Principles
In: Wild, D. (ed.) The immunoassay handbook. Elsevier Ltd, Kidlington, Oxford, 3rd edition, pp. 3–37
- DE BOER, E., und T. J. HUMPHREY (1991)
Comparison of methods for the isolation of thermophilic campylobacters from chicken products
Microbial Ecology in Health and Disease, **4**, 43
- DEBRUYNE, L., D. GEVERS und P. VANDAMME (2008)
Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*
In: Nachamkin, I., C. M. Szymanski und M. J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, 3rd edition, pp. 3–25

- DE LOS SANTOS, F. S., A. M. DONOGHUE, K. VENKITANARAYANAN, J. H. METCALF, I. REYES-HERRERA, M. L. DIRAIN, V. F. AGUIAR, P. J. BLORE und D. J. DONOGHUE (2009)
The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens
Poultry Science, **88** (1), 61–64
- DEKEYSER, P., M. GOSSUIN-DETRAIN, J. P. BUTZLER und J. STERNON (1972)
Acute enteritis due to related *vibrio*: first positive stool cultures
Journal of Infectious Diseases, **125** (4), 390–392
- DESMONTS, M.-H., F. DUFOUR-GESBERT, L. AVRAIN und I. KEMPF (2004)
Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **54**, 1025–1030
- DOYLE, L. P. (1944)
A *vibrio* associated with swine dysentery
American Journal of Veterinary Research, **5**, 3–5
- EFSA (2009)
The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007
EFSA Journal, **7**, 223
- EFSA (2010)
The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008
EFSA Journal, **8** (1), 1496
- ELLERBROEK, L., TH. ALTER, R. JOHNE, K. NÖCKLER, L. BEUTIN, R. HELMUTH (2009)
Aufgaben der veterinärmedizinischen Referenzlaboratorien im Bereich der lebensmittelbedingten Zoonosen
Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, **52** (2), 208–213
- ELLERBROEK, L. I., J. A. LIENAU und G. KLEIN (2010)
Campylobacter spp. in broiler flocks at farm level and the potential for cross-contamination during slaughter
Zoonoses Public Health, **57** (7–8), e81–88
- EI-SHAROU, W. M. (2009)
Prevalence and survival of *Campylobacter* in Egyptian dairy products
Food Research International, **42** (5–6), 622–626
- ENDTZ, H. P., G. J. H. M. RUIJS, A. H. ZWINDERMAN, T. VAN DER REIJDEN, M. BIEVER und R. P. MOUTON (1991)
Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens
Journal of Clinical Microbiology, **29**, 1007–1010

- ESCHERICH, T. (1886)
Beiträge zur Kenntniss der Darmbakterien (Teil 3).
Über das Vorkommen von Vibrionen im Darmkanal und den Stuhlgängen der Säuglinge
Münchener Medizinische Wochenschrift, **33**, 815–817, 833–835
- EUZÉBY, J. P. (2011)
LPSN-List of prokaryotic names with standing in nomenclature
<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>, 15.02.2011
- FEDERIGHI, M., C. MAGRAS, M. F. PILET, W. D., W. JOHNSON, F. JUGIAU und J. L. JOUVE (1999)
Incidence of thermotolerant *Campylobacter* in foods assessed by NF ISO 10272 standard: results of a two-year study
Food Microbiology, **16**, 195–204
- FERNIE, D. S., und R. W. PARK (1977)
The isolation and nature of campylobacters (microaerophilic vibrios) from laboratory and wild rodents
Journal of Medical Microbiology, **10** (3), 325–329
- FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT (2010)
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Amtliche Methodensammlung, Stand April 2010
Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)
- GEORGSSON, F., A. E. PORKELSSON, M. GEIRSDOTTIR, J. REIERSEN und N. J. STERN (2006)
The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses
Food Microbiology, **23** (7), 677–683
- GOOSSENS, H., L. VLAES, I. GALAND, C. VAN DEN BORRE und J. P. BUTZLER (1989)
Semisolid blood-free selective-motility medium for the isolation of campylobacters from stool specimens
Journal of Clinical Microbiology, **27** (5), 1077–1080
- HARTNACK, S., M. G. DOHERR, T. ALTER, K. TOUTOUNIAN-MASHAD und M. GREINER (2009)
Campylobacter monitoring in German broiler flocks: an explorative time series analysis
Zoonoses Public Health, **56** (3), 117–128
- HAZELEGER, W. C., C. Hermoso SANCHES, D. V. VALK und R. R. BEUMER (2005)
Rapid detection of *Campylobacter* in chicken with SimPlate and Singlepath
In: 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Gold Coast, Queensland, Australia

- HAZELEGER, W. C., J. A. WOUTERS, F. M. ROMBOUTS und A. TJAKKO (1998)
Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature
Applied and Environmental Microbiology, **64** (10), 3917–3922
- HERALD, P. J., und E. A. ZOTTOLA (1988)
Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values
Journal of Food Science, **53** (5), 1549–1562
- HINDIMARSH, L. (1943)
A case of bovine abortion in New South Wales
Australian Veterinary Journal, **15**, 175
- HINTON, A. (2006)
Growth of *Campylobacter* in media supplemented with organic acids
Journal of Food Protection, **69** (1), 34–38
- HOFFMAN, P. S., H. A. GEORGE, N. R. KRIEG und R. M. SMIBERT (1979)
Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*. II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide
Canadian Journal of Microbiology, **25**, (1), 8–16
- HOOSAIN, N., und A. J. LASTOVICA (2009)
An evaluation of the Oxoid Biochemical Identification System Campy rapid screening test for *Campylobacteraceae* and *Helicobacter* spp
Letters in Applied Microbiology, **48** (6), 675–679
- HUGHES, R. A., K. HALLETT, T. COGAN, M. ENSER und T. HUMPHREY (2009)
The response of *Campylobacter jejuni* to low temperature differs from that of *Escherichia coli*
Applied and Environmental Microbiology, **75** (19), 6292–6298
- HUMBERT, F., G. SALVAT, P. COLIN, C. LAHELLEC und G. BENNEJEAN (1989)
Rapid identification of Salmonella from poultry meat products by using 'Mucap Test'
International Journal of Food Microbiology, **8** (1), 79-83
- ICMSF (1996)
Campylobacter
In: ICMSF (ed.) Microorganisms in Foods 5 - Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, pp. 45–65
- INDRA, A (2006)
Erkennung nosokomialer Infektionen durch molekularbiologische Typisierung
In: AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH), ÖGKV Fortbildungstage Krankenhaushygiene, Wien, 11. und 12.09.2006

- INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (1995)
Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*
In: ISO 10272:1995 (E)
- INTERNATIONAL ORGANISATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2006)
Microbiology of food and feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* growing at 41,5 °C - Part 1: Detection method
In: ISO 10272-1:2006
- ISOHANNI, P. M. I., und U. LYHS (2009)
Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat
Poultry Science, **88** (3), 661–668
- JACOBS-REITSMA, W. F., I. und M. J. BLASER (2000)
Campylobacter in the food supply
In: Nachamkin, I., C. M. Szymanski und M. J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, 2nd Edition, pp. 467–481
- JASSON, V., L. JACXSENS, P. LUNING, A. RAJKOVIC und M. UYTENDAELE (2010)
Alternative microbial methods: An overview and selection criteria
Food Microbiology, **27** (6), 710–730
- JELINEK, T., Z. SABATKOVA, K. DEMNEROVA und J. PAZLAROVA (2005)
Two rapid diagnostic procedures for the identification of *Campylobacter jejuni/coli* in food matrix
Czech Journal of Food Sciences, **23**, 121–125
- JONES, F. S., M. ORCUTT und R. B. LITTLE (1932)
A continuation of the study of the aetiology of infectious diarrhoea (winter scours) in cattle
Journal of the American Veterinary Medical Association, **81**, 610
- JORE, S., H. VILJUGREIN, E. BRUN, B. T. HEIER, B. BORCK, S. ETHELBERG, M. HAKKINEN, M. KUUSI, J. REIERSEN, I. Hansson, E. O. ENGVALL, M. LOFDAHL, J. A. WAGENAAR, W. VAN PELT und M. HOFSHAGEN (2010)
Trends in *Campylobacter* incidence in broilers and humans in six European countries, 1997–2007
Preventive Veterinary Medicine, **93** (1), 33–41
- JOSEFSEN, M. H., P. S. LÜBECK, B. AALBÆK und J. HOORFAR (2003)
Preston and PARK-SANDERS protocols adapted for semi-quantitative isolation of thermotolerant *Campylobacter* from chicken rinse
International Journal of Food Microbiology, **80** (2), 177–183
- JUVEN, B. J., und I. ROSENTHAL (1985)
Effect of free-radical and oxygen scavengers on photochemically generated oxygen toxicity and on the aerotolerance of *Campylobacter jejuni*
Journal of Applied Bacteriology, **59** (5), 413–419

- KARMALI, M. A., A. K. ALLEN und P. C. FLEMING (1981)
Differentiation of catalase-positive *Campylobacters* with special reference to morphology
International Journal of Systematic Bacteriology, **31** (1), 64–71
- KAWASHIMA, H., A. IWATA und Y. SUSUKI (1954)
L'avortement a vibriion du betail et la sterilité enzootique
In: XXIIIème session du comitè de l'office, Paris
- KAWATSU, K., M. TAGUCHI, T. YONEKITA, T. MATSUMOTO, F. MORIMATSU und Y. KUMEDA (2010)
Simple and rapid detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken-meat samples by combination of a two-step enrichment method with an immunochromatographic assay
International Journal of Food Microbiology, **142** (1–2), 256–259
- KELLY, A. F., A. MARTINEZ-RODRIGUEZ, R. A. BOVILL und B. M. MACKEY (2003):
Description of a "phoenix" phenomenon in the growth of *Campylobacter jejuni* at temperatures close to the minimum for growth
Applied and Environmental Microbiology, **69** (8), 4975–4978
- KIESS, A. S., H. M. PARKER und C. D. MCDANIEL (2010)
Evaluation of different selective media and culturing tchniques for the quantification of *Campylobacter* spp. from broiler litter
Poultry Science, **89**, 1755–1762
- KING, E. O. (1957)
Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio
Journal of Infectious Diseases, **101**, 119–128
- KIST, M. (1991)
Isolierung und Identifizierung von Bakterien der Gattungen *Campylobacter* und *Helicobacter*
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, **276** (1), 124–139
- LAN, H. U. und D. J. KOPENCKO, (2003)
Campylobacter Species
In: MILIOTIS, M. D. und J. W. BIER (eds.) International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 181–197
- LAWSON, J. R. (1954)
Report to the FAO meeting on bovine infertility, with spezial reference to Vibriosis (Copenhagen), 6.–11. Dezember 1954
- LEVY, A. J. (1946)
A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*
Yale Journal of Biology and Medicine, **18**, 243–259

- LEWIS, S. J., S. VELASQUES, S. L. CUPPETT und S. R. MCKEE (2002)
Effect of electron beam irradiation on poultry meat safety and quality
Poultry Science, **81**, 896–903
- LICK, S., A. MAYR, M. MÜLLER, A. ANDERSON, H. HOTZEL und I. HUBER (2007)
Konventionelle PCR- und Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von
thermophilen *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. lari*: ein Überblick
Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **2** (2), 161–170
- LINE, J. E., und M. E. BERRANG (2005)
Comparison of two types of plating media for detection and enumeration of
Campylobacter from poultry samples
International Journal of Poultry Science, **4** (2), 81–84
- LUTTMANN, W., K. BRATKE und M. KÜPPER (2009)
Quantitative Immunoassays
In: *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3.
Auflage, pp. 107–134
- MARTIN, W. T., C. M. PATTON, G. K. MORRIS, M. E. POTTER und N. D. PUHR (1983)
Selective enrichment broth medium for isolation of *Campylobacter jejuni*
Journal of Clinical Microbiology, **17** (5), 853–855
- MATSUDA, M., und J. E. MOORE (2004)
Urease-positive thermophilic *Campylobacter* species
Applied and Environmental Microbiology, **70** (8), 4415–4418
- MCFADYEAN, J., und S. STOCKMAN (1913)
Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and
fisheries to inquire into epizootic abortion.
Appendix to Part III: Abortion in sheep
Her Majesty's Stationary Office, London, pp. 1–29
- MOORE, J. E., und R. H. MADDEN (2000)
The effect of thermal stress on *Campylobacter coli*
Journal of Applied Bacteriology, **89** (5), 892–899
- MOORHEAD, S. M., und G. A. DYKES (2002)
Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen
storage
Letters in Applied Microbiology, **34** (1), 72–76
- MURPHY, C., C. CARROLL und K. N. JORDAN (2003)
Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*
Journal of Applied Microbiology, **95** (4), 704–708
- MURPHY, C., C. CARROLL und K. N. JORDAN (2006)
Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*
Journal of Applied Microbiology, **100** (4), 623–632

- NÄTHER, G., T. ALTER, A. MARTIN und L. ELLERBROEK (2009)
Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks
Poultry Science, **88** (6), 1299–1305
- NG, L. K., C. I. KINGOMBE, W. YAN, D. E. TAYLOR, K. HIRATSUKA, N. MALIK und M. M. GARCIA (1997)
Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR
Applied and Environmental Microbiology, **63** (11), 4558–4563
- NG, L. K., R. SHERBURNE, D. E. TAYLOR und M. E. STILES (1985a)
Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron-microscopy
Journal of Bacteriology, **164** (1), 338–343
- NG, L. K., M. E. STILES und D. E. TAYLOR (1985b)
Inhibition of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by antibiotics used in selective growth media
Journal of Clinical Microbiology, **22**, 510–514
- NG, L. K., D. E. TAYLOR und M. E. STILES (1988)
Characterisation of freshly isolated *Campylobacter coli* strains and suitability of selective media for their growth
Journal of Clinical Microbiology, **26**, 518–523
- NGUYEN, V. T., M. S. TURNER und G. A. DYKES (2010)
Effect of temperature and contact time on *Campylobacter jejuni* attachment to, and probability of detachment from, stainless steel
Journal of Food Protection, **73** (5), 832–838
- NIELSEN, E. M., J. ENGBERG und M. MADSEN (1997)
Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine
FEMS Immunology and Medical Microbiology, **19** (1), 47–56
- O' BRIEN, S. J. (2003)
Ethnicity and *Campylobacter* infection: a population-based questionnaire survey
Journal of Infection, **47** (3), 210–216
- OLSON, A. (1946)
Spirillkastning
Skandinavian Veterinary Tidsskrift, **36**, 1
- OOSTEROM, J., G. J. DE WILDE, E. DE BOER, L. H. DE BLAAUW und H. KARMAN (1983)
Survival of *Campylobacter jejuni* during poultry processing and pig slaughtering
Journal of Food Protection, **46**, 702–706

- OYARZABAL, O. A., K. S. MACKLIN, J. M. BARBAREE und R. S. MILLER (2005)
Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses
Applied and Environmental Microbiology, **71** (6), 3351–3354
- PARK, S. F. (2002)
The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens
International Journal of Food Microbiology, **74** (3), 177–188
- PARKHILL, J., B. W. WREN, K. MUNGALL, J. M. KETLEY, C. CHURCHER, D. BASHAM, T. CHILLINGWORTH, R. M. DAVIES, T. FELTWELL, S. HOLROYD, K. JAGELS, A. V. KARLYSHEV, S. MOULE, M. J. PALLAN, C. W. PENN, M. A. Quail, M. A. RAJANDREAM, K. M. RUTHERFORD, A. H. VAN VLIET, S. WHITEHEAD und B. G. BARRELL (2000)
The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences
Nature, **403**, 665–668
- PATTERSON, M. F. (1995)
Sensitivity of *Campylobacter* spp. to irradiation in poultry meat
Letters in Applied Microbiology, **20** (6), 338–340
- POPE, J. E., A. KRIZOVA, A. X. GARG, H. THIESSEN-PHILBROOK und J. M. OUIMET (2007)
Campylobacter reactive arthritis: a systematic review
Seminars in Arthritis and Rheumatism, **37** (1), 48–55
- POTTURI-VENKATA, L. P., S. BACKERT, A. J. LASTOVICA, S. L. VIEIRA, R. A. NORTON, R. S. MILLER, S. PIERCE und O. A. OYARZABAL (2007)
Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers
Poultry Science, **86** (7), 1304–1311
- RAHIMI, E., M. AMERI und H. R. KAZEMEINI (2010)
Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from raw camel, beef, lamb, and goat meat in Iran
Foodborne Pathogens and Disease, **7** (4), 443–447
- REITER, M., C. LÓPEZ, R. JORDANO und L. MEDINA (2010)
Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses
Food Analytical Methods, **3** (3), 253–260
- REUTER, M., A. MALLETT, B. M. PEARSON und A. H. VAN VLIET (2010)
Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions
Applied Environmental Microbiology, **76** (7), 2122–2128
- RIDLEY, K. A., J. D. ROCK und Y. LI (2006)
Heme utilization in *Campylobacter jejuni*
Journal of Bacteriology, **188** (22), 7862–7875

- ROBERT KOCH-INSTITUT (2005)
Campylobacter Infektionen
RKI-Ratgeber für Ärzte
Epidemiologisches Bulletin
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2010)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009.
pp. 51–54
- ROBINSON, D. A. (1981)
Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk
British Medical Journal, **282**, 1584
- ROSSEN, L., P. NØRSKOV, K. HOLMSTRØM und O. F. RASMUSSEN (1992)
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and
DNA-extraction solutions
International Journal of Food Microbiology, **17** (1), 37–45
- ROWE, M. T., G. DUNSTALL, R. KIRK, C. F. LOUGHNEY, J. L. COOKE und S. R. BROWN (1998)
Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of
Campylobacter jejuni and its use to determine their resistance to disinfectants
Food Microbiology, **15** (5), 491–498
- SANDBERG, M., M. HOFSHAGEN, O. OSTENSVIK, E. SKJERVE und G. INNOCENT (2005)
Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time
Journal of Food Protection, **68** (8), 1600–1605
- SCHEU, P. M., K. BERGHOF und U. STAHL (1998)
Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase
chain reaction
Food Microbiology, **15** (1), 13–31
- SCHUSTER, A. (Coring System Diagnostix GmbH) (2002a)
SimPlate™ *Campylobacter* CI System
Persönliche Kommunikation (Telefonat) mit Dr. J. Kleer
- SCHUSTER, A. (Coring System Diagnostix GmbH) (2002b)
Campylobacter
Email an Dr. J. Kleer
- SCHUSTER, A. (Coring System Diagnostix GmbH) (2003a)
SimPlate
Email an A. Manopas, 06.03.2003, 09:09 Uhr
- SCHUSTER, A. (Coring System Diagnostix GmbH) (2003b)
Info SimPlate *Campylobacter*
Email an A. Manopas, 12.03.2003, 11:03 Uhr

- SCOTTER, S. L., T. J. HUMPHREY und A. HENLEY (1993)
Methods for detection of thermotolerant *Campylobacter* in foods: an inter-laboratory study
Journal of Applied Bacteriology, **74**, 155–163
- SENER, A., und A. TEMIZ (2007)
Efficacy of some commercial disinfectants against the bacterial isolates from a poultry slaughterhouse in Turkey
Annals of Microbiology, **57** (1), 101–109
- SHIMSHONY, A. (2009)
Enteric campylobacteriosis is a common zoonotic infection
<http://www.infectiousdiseaseneews.com/article/36568.aspx>, 01.01.2009
- SILLEY, P. (2003):
Campylobacter and fluoroquinolones: a bias data set ?
Applied Environmental Microbiology, **5** (4), 219–230
- SINTON, L., C. HALL und R. BRAITHWAITE (2007)
Sunlight inactivation of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica*, compared with *Escherichia coli*, in seawater and river water
Journal of Water and Health, **5** (3), 357–365
- SJOLIEMA, P., T. STEGENGA und J. TERPESTRA (1949)
Infectious sterility in cattle caused by *Vibrio foetus*
In: XIVth Internat. Vet. Congress, London
- SKIRROW, M. B. (1977)
Campylobacter enteritis – new disease
British Medical Journal, **2**, 9–11
- SKIRROW, M. B. (1990)
Campylobacter
Lancet, **336** (8720), 921–923
- SKIRROW, M. B. (1991)
Epidemiology of *Campylobacter* enteritis
International Journal of Food Microbiology, **12** (1), 9–16
- SKIRROW, M. B., G. L. TURNBULL, R. E. WALKER und S. E. YOUNG (1980)
Campylobacter jejuni enteritis transmitted from cat to man
Lancet, **315** (8179), 1188
- SKIRROW, M. B., D. M. JONES, E. SUTCLIFFE und J. BENJAMIN (1993)
Campylobacter bacteraemia in England and Wales, 1981–91
Epidemiology and Infection, **110** (3), 567–573

- SMIBERT, R. M. (1974)
Campylobacter
In: Buchanan, R. E., und Gibbons, N. E. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 207–212
- SMIBERT, R. M. (1978)
The Genus *Campylobacter*
Annual Review of Microbiology, **32**, 673–709
- SMIBERT, R. M. (1984)
Campylobacter
In: Krieg, N R., und Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 111–118
- SMITH, T. (1918)
Spirilla associated with disease of the fetal membranes in cattle (infectious abortion)
Journal of Experimental Medicine, **28**, 701–719
- SMITH, T., und M. ORCUTT (1927)
Vibrios from calves and their serological relationship to *Vibrio fetus*
Journal of Experimental Medicine, **45**, 391
- SMITH, T., und M. S. TAYLOR (1919)
Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, N. SP) associated with disease of the fetal membranes in cattle
Journal of Experimental Medicine, **30**, 299–311
- SMOLE-MOZINA, S., M. KURINCIC, A. KRAMAR, S. URSIC und V. KATALINIC (2009)
Prevalence and resistance against different antimicrobial compounds of *Campylobacter* spp. in/from retail poultry meat
Tehnologija Mesa, **5** (1–2), 112–120
- STEAD, D. und S. F. PARK (2000)
Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress
Applied and Environmental Microbiology, **66** (7), 3110–3112
- STEELE, T. W., N. SANGSTER und J. A. LANSER (1985)
DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in central and South Australia
Journal of Clinical Microbiology, **22** (1), 71–74
- STOYANCHEV, T., I. VASHIN, C. RING und V. ATANASSOVA (2007)
Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry products for sale on the Bulgarian retail market
Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, **92** (3), 285–288

- SVENSSON, S. L., E. FRIRDICH, E. C. GAYNOR, I. NACHAMKIN, C. M. SZYMANSKI und M. J. BLASER (2008)
Survival Strategies of *Campylobacter jejuni*: Stress Response, the Viable but Nonculturable State and Biofilms
In: Nachamkin, I., C. M. Szymanski und M. J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, 3rd Edition, pp. 571–590
- TANGVATCHARIN, P., S. CHANTHACHUM, P. KOPAIBOON, N. INTTASUNGKHA und M. W. GRIFFITHS (2005)
Comparison of methods for the isolation of thermotolerant *Campylobacter* from poultry
Journal of Food Protection, **68**, 616–620
- TRIBE, G. W., P. S. MACKENZIE und M. P. FLEMING (1979)
Incidence of thermophilic *Campylobacter* species in newly imported simian primates with enteritis
Veterinary Record, **105** (14), 333
- URADZINISKI, J., und M. NYESVYETOWA (2009)
Survival rate of thermotolerant *Campylobacter* on poultry meat during microwave heating
Polish Journal of Veterinary Sciences, **12** (1), 41–44
- VANDAMME, P. (2000)
Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*
In: Nachamkin, I., und M. J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. ASM Press, Washington, DC, 2nd Edition, pp. 3–26
- VANDAMME, P., und J. DELEY (1991)
Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*
International Journal of Systematic Bacteriology, **41**, 451–455
- VÉRON, M., und R. CHATELAIN (1973)
Taxonomic study of genus *Campylobacter*
International Journal of Systematic Bacteriology, **23** (2), 122–134
- VERON, M., und M. SEBALD (1963)
Teneur en bases de l'ADN et la position taxonomique des vibrions
Annales de l'Institut Pasteur Microbiology, **105** (3), 897–911
- Vinzent, R., J. DUMAS und N. PICARD (1947)
Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibrion. A vortement consécutif
Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, Paris, **131**, 90
- WACHECK, S., M. FREDRIKSSON-AHOMAA, M. KÖNIG, A. STOLLE und R. STEPHAN (2010)
Wild boars as an important reservoir for foodborne pathogens
Foodborne Pathogens and Disease, **7** (3), 307–312

- WANG, E.-L. L., B. W. POWERS, N. W. LUECHTEFELD und M. J. BLASER (1983)
Effects of disinfectants on *Campylobacter jejuni*
Applied and Environmental Microbiology, **45** (4), 1202–1205
- WANG, G., C. G. CLARK, T. M. TAYLOR, C. PUCKNELL, C. BARTON, L. PRICE, D. L. WOODWARD
und F. G. RODGERS (2002)
Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter*
jejuni, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus ssp. fetus*
Journal of Clinical Microbiology, **40** (12), 4744–4747
- WARD, B. Q. (1948)
The apparent involvement of *V. fetus* in an infection of man
Journal of Bacteriology, **55**, 113–114
- WASSENAAR, T. M. (2000)
Molekularmethoden als Nachweis, Spezifizierung und Subtypisierung von
Campylobacter spp.
In: Lohmann Information (Mainz), pp. 13–19
- WEINKE, T. und O. LIESENFELD (2008)
Darm
In: MARRE, R., T. MERTENS, M. TRAUTMANN und W. ZIMMERLI (eds.) Klinische
Infektiologie. Elsevier GmbH, München, 2. Auflage, pp. 429–464
- WICHELHAUS, TH. A., V. SCHÄFER, V. BRADE (2000)
Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie
Chemotherapie Journal, **9**, (2), 93–98
- WIEHLMANN, L., N. CRAMER, B. TÜMMEL (2007)
Bakterientypisierung – Chipgenotypisierung von Bakterien
BIOspektrum, **13**, 640–642
- WORKMAN, S. N., G. E. MATHISON und M. C. LAVOIE (2005)
Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados
Journal of Clinical Microbiology, **43** (6), 2642–2650

9 Anhang

Tab. 16: Bei den Versuchen verwendete Geflügelfleischsorten

| Versuchsnummer | Verwendete Geflügelfleischsorte |
|----------------|---------------------------------|
| V 1 bis V 16 | Hähnchenfleisch |
| S 1 bis S 63 | Hähnchenfleisch |
| S 64 bis S 90 | Putenfleisch |
| S 91 bis S 100 | Hähnchenfleisch |

Tab. 17: Ergebnisse der Vorversuche

| | ISO | SimPlate™ Campylobacter CI System | | | | |
|-----|--------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---|---|
| | MPN / g (Stichzahl/ Kategorie) | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz*) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des verdächtigen Wattetupfers | KbE / g |
| V 1 | 28 (221/ 3) | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 2 | 1100 (332/ 1) | 1 (nach 96 h Bebrütung: 43) | 1 (nach 96 h Bebrütung: 43) | nein (nach 96 h Bebrütung: ja) | entfällt (nach 96 h Bebrütung: nein) | 40 (nach 96 h Bebrütung: 2400) |
| V 3 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 4 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 5 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 6 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 7 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |

| | | | | | | |
|------|-----------------------------|---|----------|------|----------|------|
| V 8 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 9 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 10 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 11 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 12 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 13 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 14 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 15 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |
| V 16 | nicht nachweisbar in 1 g | 0 | entfällt | nein | entfällt | < 20 |

*Grundsätzlich ist eine Fluoreszenz aller Kavitäten unabhängig von der Färbung vorhanden, weil das Phänomen auch bei den Positivkontrollen auftritt, wird dies bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tab. 18: Auswertung der positiven Ergebnisse aus der ISO 10272:1995 (E)-Methode im ISO-MPN-Verfahren

| | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|-------|--------|
| Anzahl der | | | | | | | |
| Vedünnungsstufen: | | 3 | | | | | |
| Verdünnungen: | | 10 | 1,0 | 0,1 | | | |
| Anzahl der Röhren: | | 3 | 3 | 3 | | | |
| | | 3 x 10 g | 3 x 1,0 g | 3 x 0,1 g | Vertrauensbereich | | |
| Probe | Anzahl positiver Ergebnisse | MPN/g | Kategorie | ~ 95 % | | | |
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | | | | |
| V 1 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 1 | 20,00 | 480,00 |
| V 2 | 2 | 2 | 1 | 28 | 3 | 0,70 | 11,10 |
| S 29 | 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1 | 0,10 | 3,60 |

Anhang

| | | | | | | | |
|--|---|---|---|------------------|---|-------|--------|
| S 30 | 3 | 0 | 0 | 23 | 1 | 0,30 | 11,10 |
| S 33 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0,00 | 1,20 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | | | | |
| S 35 | 3 | 3 | 1 | 460 | 1 | 7,00 | 235,0 |
| S 39 | 2 | 1 | 0 | 150 | 1 | 0,30 | 4,30 |
| S 41 | 3 | 2 | 0 | 93 | 1 | 1,60 | 36,00 |
| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | | | | |
| S 42 | 3 | 3 | 1 | 460 | 1 | 7,00 | 235,00 |
| S 57 | 3 | 3 | 3 | > 1100 | - | - | - |
| S 58 | 3 | 3 | 3 | > 1100 | - | - | - |
| S 62 | 3 | 3 | 3 | > 1100 | - | - | - |
| S 63 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 1 | 20,00 | 480,00 |
| S 64 | 2 | 1 | 0 | 15 | 1 | 0,30 | 4,30 |
| S 65 | 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1 | 0,10 | 3,60 |
| S 66 | 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1 | 0,10 | 3,60 |
| S 68 | 2 | 2 | 0 | 21 | 1 | 0,30 | 4,60 |
| S 72 | 1 | 0 | 0 | 3,6 | 1 | 0,01 | 2,00 |
| S 73 | 1 | 0 | 0 | 3,6 | 1 | 0,01 | 2,00 |
| S 84 | 3 | 1 | 0 | 43 | 1 | 1,70 | 20,00 |
| S 89 | 3 | 2 | 1 | 150 | 1 | 3,00 | 44,00 |
| S 90 | 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1 | 0,10 | 3,60 |
| S 92 | 3 | 3 | 3 | > 1100 | - | - | - |
| S 100 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 1 | 20,00 | 480,00 |

Campylobactergehalte im Nachweisbereich des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems sind im Fettdruck dargestellt.

Tab. 19: Quantitativer und qualitativer Vergleich der Ergebnisse der ISO 10272:1995 (E)-Methode mit den Ergebnissen der PCR und des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems

| Probe | ISO / PCR | | | SimPlate™ |
|--|--------------------------|--------------------|---------|-----------|
| | Spezies | | MPN / g | KbE / g |
| | ISO | PCR | | |
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | |
| S 1 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 2 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 3 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 4 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 5 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 6 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 7 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 8 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 9 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S10 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 11 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 12 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 13 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 14 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 15 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 16 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 17 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 18 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 19 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 20 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 21 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 22 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 23 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |

| | | | | |
|--|--|-----------------------------------|-----|------|
| S 24 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 25 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 26 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 27 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 28 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 29 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 9,2 | < 20 |
| S 30 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 23 | < 20 |
| S 31 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 32 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 33 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> | 3 | < 20 |
| S 34 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 35 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> | 460 | < 20 |
| S 36 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 37 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | |
| S 38 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 39 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> | 150 | < 20 |
| S 40 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 41 | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> / <i>C. lari</i> | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | 93 | < 20 |
| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | |
| S 42 | <i>C. coli</i> / <i>C. lari</i> | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | 460 | 20 |
| S 43 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 44 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 45 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 46 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 47 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 48 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 49 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 50 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 51 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |

Anhang

| | | | | |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|------|
| S 52 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 53 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 54 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 55 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 56 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 57 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | >1100 | < 20 |
| S 58 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | >1100 | < 20 |
| S 59 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 60 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 61 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 62 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | >1100 | 1000 |
| S 63 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 1100 | 240 |
| S 64 | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | 15 | < 20 |
| S 65 | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> | 9,2 | < 20 |
| S 66 | <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | 9,2 | < 20 |
| S 67 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 68 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 21 | < 20 |
| S 69 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 70 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 71 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 72 | <i>C. jejuni</i> | <i>Campylobacter</i> spp. | 3,6 | < 20 |
| S 73 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 3,6 | < 20 |
| S 74 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 75 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 76 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 77 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 78 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 79 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 80 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 81 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 82 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |

| | | | | |
|-------|---|--------------------|--------|------|
| S 83 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 84 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 43 | < 20 |
| S 85 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 86 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 87 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 88 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 89 | <i>C. lari</i> | <i>C. jejuni</i> | 150 | 40 |
| S 90 | <i>C. jejuni</i> | <i>C. jejuni</i> | 9,2 | < 20 |
| S 91 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 92 | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> / <i>C. upsaliensis</i> | <i>C. jejuni</i> | > 1100 | 20 |
| S 93 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 94 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 95 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 96 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 97 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 98 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 99 | nicht nachweisbar in 1 g | nicht durchgeführt | < 3 | < 20 |
| S 100 | <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> | <i>C. jejuni</i> | 1100 | < 20 |

Tab. 20: Ergebnisse der Untersuchung mit dem SimPlate™ Campylobacter CI-System

| Probe | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des verdächtigen Wattetupfers | Auswertung: KbE / g |
|--|--|---|-----------------------------|---|---------------------|
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | | |
| S 1 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 2 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 3 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 4 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 5 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |

Anhang

| | | | | | |
|------|---|----------|---------|----------|------|
| S6 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 7 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 8 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 9 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S10 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 11 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 12 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 13 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 14 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 15 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 16 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 17 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 18 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 19 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 20 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 21 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 22 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 23 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 24 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 25 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 26 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 27 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 28 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 29 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 30 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 31 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |

| | | | | | |
|--|---|----------|---------|----------|-----------|
| S 32 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 33 | 0 | entfällt | positiv | ja | < 20 |
| S 34 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 35 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 36 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 37 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | | |
| S 38 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 39 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 40 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 41 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | | |
| S 42 | 0 | entfällt | positiv | nein | 20 |
| S 43 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 44 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 45 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 46 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 47 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 48 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 49 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 50 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 51 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 52 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 53 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 54 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 55 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |

Anhang

| | | | | | |
|------|----|----------|---------|----------|-------------|
| S 56 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 57 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 58 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 59 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 60 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 61 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 62 | 22 | 22 | positiv | nein | 1000 |
| S 63 | 6 | 6 | positiv | nein | 240 |
| S 64 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 65 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 66 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 67 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 68 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 69 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 70 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 71 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 72 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 73 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 74 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 75 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 76 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 77 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 78 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 79 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 80 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 81 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |

| | | | | | |
|-------|---|----------|---------|----------|-----------|
| S 82 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 83 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 84 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 85 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 86 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 87 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 88 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 89 | 1 | 1 | negativ | entfällt | 40 |
| S 90 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 91 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 92 | 0 | entfällt | positiv | nein | 20 |
| S 93 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 94 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 95 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 96 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 97 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 98 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 99 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |
| S 100 | 0 | entfällt | negativ | entfällt | < 20 |

Tab. 21: Auswertung der Positivkontrollen unter Verwendung von *Campylobacter* spp.-Koloniematerial ohne die Verwendung von Geflügelfleisch mit einem *Campylobacter*-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze

| | <i>Campylobacter</i> spp. | ISO 10272: 1995 (E) | SimPlate™ <i>Campylobacter</i> CI-System | | | | KbE / g |
|--|---------------------------|---------------------|--|--|-----------------------------|---|---------|
| | | | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz*) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des verdächtigen Wattetupfers | |
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|--|------------------|---------|-----------------|----|--------------|------|---------|
| 1 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 2 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 3 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 4 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 5 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 6 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 7 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 8 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 9 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 10 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 11 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 12 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | | | | |
| 13 | <i>C. coli</i> | positiv | 63 | 63 | ja | nein | 4640 |
| 14 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | | | | |
| 15 | <i>C. coli</i> | positiv | 0 | - | nein | - | <20 |
| 16 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 (schwach) | 84 | ja (schwach) | nein | >14.760 |
| 17 | <i>C. coli</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 18 | <i>C. jejuni</i> | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |

Tab. 22: Auswertung der artifiziell kontaminierten Proben unter Verwendung von *Campylobacter* spp.-Koloniematerial und Geflügelfleisch mit einem *Campylobacter*-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze

| | C. spp. | Art des Geflügelfleischzusatzes | ISO 10272: 1995 (E) | SimPlate™ | | | | KbE / g |
|--|----------------|--|----------------------------|--|--|-----------------------------|---|----------------|
| | | | | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz*) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des verdächtigen Wattetupfers | |
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | | | | | |
| 1 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 0 | ja | ja | <20 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|--|------------------|------|---------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------|
| 2 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 83 | 0 | ja | ja | <20 |
| 3 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (z. T. schwach fluoreszierend) | ja | nein | >14.760 |
| 4 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (z. T. schwach fluoreszierend) | ja | nein | >14.760 |
| 5 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 75 | 0 | ja | nein | <20 |
| 6 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 56 | 0 | ja | ja | <20 |
| 7 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | >14.760 |
| 8 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | >14.760 |
| 9 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | >14.760 |
| 10 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | >14.760 |
| 11 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 12 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 13 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 76 | 76 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | 7840 |
| 14 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 (schwach fluoreszierend) | ja | schwach fluoreszierend | >14.760 |
| 15 | <i>C. coli</i> | Pute | positiv | 70 | 0 | ja | ja | <20 |
| 16 | <i>C. jejuni</i> | Pute | positiv | 12 | 12 | nein | nein | 520 |
| 17 | <i>C. jejuni</i> | Pute | positiv | 9 | 8 | ja | nein | 320 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | | | | | |
| 18 | <i>C. coli</i> | Pute | positiv | 80 | 0 | ja | ja | <20 |
| 19 | <i>C. jejuni</i> | Pute | positiv | 67 | 67 | ja | nein | 5320 |
| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | | | | | |
| 20 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 0 | - | ja (schwach fluoreszierend) | nein | <20 |
| 21 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 82 (schwach fluoreszierend) | 82 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | 12480 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|----|------------------|------|---------|-----------------------------|----|-----------------------------|------|---------|
| 22 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 (schwach fluoreszierend) | 84 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | >14.760 |
| 23 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 24 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 (schwach fluoreszierend) | 84 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | >14.760 |
| 25 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 26 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 (schwach fluoreszierend) | 84 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | >14.760 |
| 27 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 28 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 (schwach fluoreszierend) | 84 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | >14.760 |
| 29 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 30 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 (schwach fluoreszierend) | 84 | ja (schwach fluoreszierend) | nein | >14.760 |
| 31 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 32 | <i>C. coli</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |
| 33 | <i>C. jejuni</i> | Huhn | positiv | 84 | 84 | ja | nein | >14.760 |

Tab. 23: Ergebnisse der während der Versuchsreihen angelegten Negativkontrollen

| | Geflüge fleischz usatz | ISO 10272: 1995 (E) | SimPlate™ | | | | | KbE / g |
|--|------------------------------|------------------------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------------|--|---------|
| | | | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des Wattetupfers | Fluoreszenz der Wells unabhängig von der Färbung | |
| Probenmaterial fein zerkleinert (Gewinnungsverfahren A) | | | | | | | | |
| 1 | - | negativ | 0 | - | nein | - | ja | < 20 |
| 2 | - | negativ | 0 | - | nein | - | ja | < 20 |
| 3 | Pute | negativ | 0 | - | nein | - | nein | < 20 |
| 4 | Huhn | negativ | 0 | - | nein | ja | ja | < 20 |
| 5 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 6 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| Gewinnungsverfahren A mit anschließendem Filtrieren | | | | | | | | |
| 7 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |

| Probenmaterial nicht fein zerkleinert, nur gestomachert (Gewinnungsverfahren B) | | | | | | | | |
|--|---|---------|---|---|------|------|------|------|
| 8 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 9 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 10 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 11 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 12 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 13 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 14 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 15 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |
| 16 | - | negativ | 0 | - | nein | nein | nein | < 20 |

Tab. 24: Untersuchung dreier *E. coli*-Stämme mit Hilfe des SimPlate™ Campylobacter CI-Systems zur Überprüfung auf eventuell falsch-positive Reaktionen

| | <i>E. coli</i> -Stamm | Geflügel-fleischzusatz | KbE / ml der eingesetzten Verdünnungsstufe | SimPlate™ | | | | KbE / g |
|---|--------------------------|------------------------|--|--|--|-----------------------------|---|---------|
| | | | | Anzahl verdächtiger Kavitäten (Rotfärbung) | Anzahl positiv bestätigter Kavitäten (ohne Fluoreszenz*) | Rotfärbung des Wattetupfers | Fluoreszenz des verdächtigen Wattetupfers | |
| 1 | laborspezifisch | Huhn | 16 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 2 | <i>E. coli</i> DSM 1103 | Huhn | 20 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 3 | <i>E. coli</i> DSM 30083 | Huhn | 69 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 4 | laborspezifisch | Huhn | 3 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 5 | <i>E. coli</i> DSM 1103 | Huhn | 6 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 6 | <i>E. coli</i> DSM 30083 | Huhn | 3 | 0 | - | nein | nein | < 20 |

Anhang

| | | | | | | | | |
|----|--------------------------------|------|----|---|---|------|------|------|
| 7 | laborspezifisch | Pute | 16 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 8 | <i>E. coli</i> DSM 1103 | Pute | 20 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 9 | <i>E. coli</i> DSM 30083 | Pute | 69 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 10 | laborspezifisch | Pute | 3 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 11 | <i>E. coli</i> DSM 1103 | Pute | 6 | 0 | - | nein | nein | < 20 |
| 12 | <i>E. coli</i> DSM 30083 | Pute | 3 | 0 | - | nein | nein | < 20 |

Tab. 25: Probennummer-Entsprechungen bei PCR und bei kultureller Untersuchung (Hauptversuche)

| Probennummer bei der PCR-Analyse | Probennummer bei der kulturellen Untersuchung |
|----------------------------------|---|
| 13 | S 29 |
| 14 | S 30 |
| 17 | S 33 |
| 18 | S 35 |
| 22 | S 39 |
| 24 | S 41 |
| 25 | S 42 |
| 27 | S 57 |
| 28 | S 58 |
| 29 | S 62 |
| 30 | S 63 |

| Probennummer bei der PCR-Analyse | Probennummer bei der kulturellen Untersuchung |
|----------------------------------|---|
| 31 | S 64 |
| 32 | S 65 |
| 33 | S 66 |
| 34 | S 68 |
| 35 | S 72 |
| 36 | S 73 |
| 37 | S 84 |
| 38 | S 89 |
| 39 | S 90 |
| 40 | S 92 |
| 41 | S 100 |

10 Publikationsliste

Teilergebnisse der Untersuchungen wurden publiziert:

MANOPAS, A., G. HILDEBRANDT und J. KLEER (2007)

Vergleich des SimPlate-Systems mit dem kulturellen Standardverfahren beim Nachweis von *Campylobacter*.

In: 48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, 25.-28.9.2007, Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe, Programm- und Abstract-Band, p. 155

11 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Goetz Hildebrandt nicht nur für die Überlassung des Themas bedanken, sondern ganz besonders auch für die geduldige Unterstützung sowie jederzeitige Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung meiner Dissertationsarbeit und meiner Tätigkeiten im Institut für Lebensmittelhygiene.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Dr. Josef Kleer, der sich immer Zeit nahm, sowohl fachliche als auch grammatikalische Fragen zu beantworten.

Prof. Dr. Thomas Alter möchte ich für den notwendigen Anschub, die Motivation und den nötigen Freiraum im Rahmen meiner Tätigkeit im Institut für Lebensmittelhygiene danken, die maßgeblich zur letztendlichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt ihm und dem Bundesinstitut für Risikobewertung außerdem für die Durchführung der PCR-Untersuchung meiner positiven Proben.

Außerdem danke ich allen aktuellen und auch ehemaligen Institutsangehörigen, die mich unterstützt haben, ganz besonders Bettina für die lustigsten Anekdoten, Brigitte, die mir zu jeder Zeit nicht nur in Laborfragen zur Seite stand, Christel für ihre ganz persönliche Art der Motivation und Sabine für ihre Hilfe in Sachen Word.

Julia danke ich für stundenlanges Lachen, das ausdauernde Korrekturlesen, den Halbgeviertstrich und die Konjunkionalgruppe mit als und wie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Marion, die niemals müde wurde mich aufzumuntern, zu unterstützen und Problemlösungen zu finden. Sie ist in dieser Zeit für mich viel mehr als nur die weltbeste Kollegin geworden, nämlich eine sehr gute Freundin und unersetzliche zweite Gehirnhälfte.

Katharina möchte ich ganz herzlich für den fortwährenden Zuspruch und ihre stete Hilfsbereitschaft danken.

Dany hat trotz großer Distanz, viel zu seltenen persönlichen Gesprächen und Treffen, niemals aufgegeben, mich immer wieder zu motivieren und mir zuzureden. Vielen Dank für diese beständige Freundschaft in allen Lebensbereichen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei Tanja für ihren unermüdlichen Einsatz, mir den Rücken frei zu halten, die Fähigkeit, Unmögliches möglich zu machen, und das geduldige Ertragen meiner Launen bedanken. Ohne sie wäre alles viel schwerer gewesen.

David danke ich nicht nur für die Unterstützung in jeder Phase meiner Dissertationsarbeit, sondern auch für die Unerschütterlichkeit, mir stets, ungeachtet eigener Interessen, in jeder Lebenslage zur Seite zu stehen. Er ist die Konstante in meinem Leben.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern danke ich für das Vertrauen in mich, die Möglichkeit, mich in jeder Hinsicht frei entfalten zu dürfen und dabei immer ihrer uneingeschränkten Unterstützung und ihres Rückhaltes sicher zu sein.

12 Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit ist von mir selbständig angefertigt worden. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Aranya Sira Manopas

Berlin, 14.10.2011