

2 Schrifttum

2.1 Historischer Überblick und Bedeutung

Im Jahre 1884 beschrieb der Kinderarzt THEODOR ESCHERICH erstmals „nicht anzüchtbare“ Bakterien mit spiralförmiger Morphologie, welche er aus dem Darminhalt von Säuglingen mit Diarrhoe isoliert hatte. Zwei Jahre später gelang ihm die Isolierung von ebenfalls spiralförmigen Darmbakterien aus dem Kot von an Diarrhoe erkrankten Katzen, die er *Vibrio felinus* nannte (ESCHERICH, 1886). GAMALEIA berichtete 1888 über einen Enteritiserreger des Geflügels mit der Bezeichnung *Vibrio metschnikovii*. Auch SMITH (1891) und KUTSCHER (1895) beschrieben schon im 19. Jahrhundert das Vorkommen von vibrionenähnlichen Keimen im Kot von Schweinen. 1913 konnten MCFADYEAN und STOCKMAN aus der Lochialflüssigkeit von Mutterschafen, die abortiert hatten, und später auch aus abortierten Schaf- und Rinderföten Bakterien isolieren, welche sie aufgrund ihrer gekrümmten Form und schnellen Beweglichkeit den Vibrionen zuordneten. SMITH und TAYLOR wiesen 1919 ebenfalls morphologisch ähnliche Bakterien aus dem Darminhalt abortierter Rinderföten nach und nannten den Erreger *Vibrio fetus*.

Ein dem *Vibrio fetus* ähnlicher, serologisch aber nicht identischer mikroaerophiler Keim wurde 1927 von SMITH und ORCUTT und später auch von JONES et al. (1931) aus dem Jejunum von Kälbern mit Diarrhoe isoliert und als *Vibrio jejuni* bezeichnet. Weitere mikroaerophile Mikroorganismen wurden im Colon von dysenterischen Schweinen (DOYLE, 1944) gefunden und wegen ihrer Vibrionenähnlichkeit mit der Bezeichnung *Vibrio coli* versehen (DOYLE, 1948).

In menschlichen Stuhl- und Blutproben von Patienten mit Gastroenteritis konnten erst 1946 mehrfach gewundene Vibrionen, die sich nicht anzüchten ließen, von LEVY nachgewiesen werden. Er vermutete einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Rohmilch und den Gastroenteritis-Ausbrüchen und nannte die isolierten Keime aufgrund ihrer morphologischen Verwandtschaft ebenfalls *Vibrio fetus*. Im darauffolgenden Jahr gelang erstmals die Isolierung von einem so genannten *Vibrio fetus* aus dem Blut von Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen (VINCENT et al., 1947).

KING beschrieb 1957 das Vorkommen von vier Bakterienstämmen, die sie aus dem Blut enteritiskrankter Kinder isoliert hatte. Sie entdeckte, daß sich diese Bakterienstämme von den *Vibrio fetus*-Stämmen im Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Temperaturen abgrenzten: Ihre Stämme hatten gleiche morphologische Merkmale, wuchsen dafür aber nur bei +42°C und nicht bei +25°C. Sie wurden deshalb als „closely related vibrios“, also mit Vibrionen verwandt, bezeichnet und konnten in den 50er und 60er Jahren wiederholt aus dem Blut, nicht jedoch aus Stuhlproben von Patienten mit Gastroenteritis isoliert werden.

Erst durch Anwendung von Membranfiltration und antibiotikahaltigen Selektivnährböden (DEKEYSER et al., 1972) wurde die Isolierung von den nach der neuen Nomenklatur *Campylobacter* genannten Keimen (SEBALD und VÉRON, 1963) in der Routinediagnostik ermöglicht. Die Entwicklung verbesserter Nachweisverfahren für *Campylobacter*-Spezies führte zunehmend zu einer weltweiten Wahrnehmung insbesondere von *C. jejuni* und *C. coli* als bakterielle Enteritiserreger des Menschen (BUTZLER et al., 1973; SKIRROW, 1977; DE MOL und BOSMANS, 1978; STEELE und MC DERMOTT, 1978; BUTZLER und SKIRROW, 1979; MÜLLER, 1980; PEARSON und HEALING, 1992; KETLEY, 1997; KIST, 2002).

In einigen industrialisierten Ländern (USA, Kanada, Großbritannien, Niederlande, Dänemark, Schweden) treten *Campylobacter* spp. mittlerweile als häufigste Ursache für bakterielle Enteritiden in Erscheinung (TAUXE, 1992; NACHAMKIN, 1997). In Deutschland nahmen sie in dieser Hinsicht mit 47.876 gemeldeten Fällen im Jahr 2003 nach den Salmonellosen den zweiten Rang ein (ROBERT-KOCH-INSTITUT-RKI, 2004).

2.2 Taxonomie

Zu Beginn der taxonomischen Einteilung wurden Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Bakterienspezies anhand morphologischer und biochemischer Merkmale beurteilt. Erst mit Einführung der Molekularbiologie und des phylogenetischen Vergleiches von Genom-Sequenzen wurden neue Einteilungen ermöglicht.

Zunächst erfolgte bei *Campylobacter* spp. aufgrund morphologischer Kriterien eine Einordnung in die Gattung *Vibrio* (SMITH und TAYLOR, 1919). SEBALD

und VÉRON trafen 1963 die Entscheidung, *Vibrio fetus* und „closely related vibrios“ von der Spezies *Vibrio cholerae* wegen ihres niedrigeren Guanin-Cytosin-Gehaltes der DNA abzugrenzen (*Vibrio fetus*: 34,3 +/- 0,6 mol%; *Vibrio cholerae*: 47,2 +/- 0,7 mol%). Sie gaben diesen mikroaerophilen, nicht fermentierenden Vibrionen den Namen *Campylobacter* (griech.: campylos= gebogen, bacterion= Stäbchen).

Die Gattung *Campylobacter* zeigte sich jedoch phänotypisch und genotypisch (DNA-Homologie) uneinheitlich. Daraus resultierten einerseits unterschiedliche Nomenklatur-Systeme (VÉRON und CHATELAIN, 1973; SMIBERT, 1974) und andererseits laufend neu beschriebene Spezies. Nach elektronenmikroskopischen Vergleichsuntersuchungen von *Vibrio fetus* und *Spirillum serpens* durch RITCHIE et al. wurde 1966 die Gattung *Campylobacter* der Familie der *Spirillaceae* zugeordnet. VÉRON und CHATELAIN beschrieben 1973 ein ausführliches Klassifizierungssystem, wonach weitere ehemalige Vibrionen in die Gattung *Campylobacter* eingefügt wurden.

Erkenntnisse über kulturelle Unterschiede (SKIRROW und BENJAMIN, 1980b), Abweichungen in Morphologie (KARMALI et al., 1981) sowie über verschiedene anaerobe Stoffwechselfähigkeiten (RAZI und PARK, 1982; VÉRON und LENVOISÉ-FURET, 1982) und unterschiedliche zelluläre Fettsäurezusammensetzungen (BLASER et al., 1980b; CURTIS, 1982; JOHNSON et al., 1982) führten dazu, daß „thermophile“ *Campylobacter* als eigenständige Gruppe betrachtet wurden (SKERMAN et al., 1980). Innerhalb dieser thermophilen *Campylobacter*-Spezies wurde zwischen *C. jejuni* (mit Biotypen 1 und 2) und *C. coli* differenziert (SKIRROW und BENJAMIN, 1980a). Stämme, die im Gegensatz zu der *C. jejuni/coli*-Gruppe Nalidixinsäure-resistent waren, wurden zunächst als NARTC-Stämme (nalidixic-acid-resistant *campylobacters*) bezeichnet und später mit dem Namen *C. laridis* versehen (BENJAMIN et al., 1983). 1990 wurde *C. laridis* durch VON GRAEVENITZ in *C. lari* umbenannt.

Anfang der 90er Jahre erfolgte auf der Grundlage genetischer Untersuchungen eine neue Einteilung in der Nomenklatur (VANDAMME und DE LEY, 1991; VANDAMME et al., 1991; VANDAMME und GOOSENS, 1992). Die *Campylobacteraceae* wurde als neue Familie eingeführt, welche sich in die beiden Gattungen *Campylobacter* und *Arcobacter* gliederte, nachdem bereits 1989 die Gattung *Helicobacter* aufgrund abweichender phänotypischer und geno-

typischer Eigenschaften abgegrenzt worden war (GOODWIN et al., 1989). *Arcobacter* spp. unterschieden sich von *Campylobacter* spp. durch die Sauerstofftoleranz und das Wachstum bei niedrigen Temperaturen von +15°C bis +25°C (VANDAMME et al., 1992).

Nach neuesten Veröffentlichungen von Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology, 2nd Edition (GARRITY et al., 2002), untergliedert sich die Familie *Campylobacteraceae* in Gattung I *Campylobacter*, Gattung II *Arcobacter* und Gattung III *Sulfurospirillum*. Zur Zeit sind 17 Spezies und 6 Subspezies von *Campylobacter* spp. anerkannt. Die wichtigsten Spezies sind *C. jejuni* (mit subsp. *jejuni* und *doylei*), *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus fetus*, *C. upsaliensis*, *C. sputorum* (mit subsp. *sputorum* und *bulbulus*), *C. hyointestinalis* (mit subsp. *hyointestinalis* und *lawsonii*) und *C. mucosalis*.

Die Spezies *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* werden als thermophil charakterisiert, da sie sich nur bei Temperaturen von +37°C bis +42°C vermehren (PENNER, 1991). *C. jejuni* und *C. coli* besitzen als wichtigster Erreger der *Campylobacter*-Enteritis des Menschen, heute zunehmend Campylobakteriose genannt, die größte gesundheitspolitische Bedeutung. In der Abb. 1 werden *Campylobacter* spp. nach der aktuellen Taxonomie von Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology dargestellt.

Reich/Regum: *Bacteria/Archaea*

Abteilung/Phylum BXII: *Proteobacteria* phy. nov.

Klasse/Classis V: *Epsilonproteobacteria*

Ordnung/Ordo I: *Campylobacterales*

Familie/Familia I: *Campylobacteriaceae*

Gattung/Genus I: *Campylobacter*

Gattung/Genus II: *Arcobacter*

Gattung/Genus III: *Sulfurospirillum*

Familie/Familia II: *Helicobacteraceae*

Abb. 1: Taxonomie von *Campylobacter* spp. (GARRITY et al., 2002)

2.3 Morphologische und kulturelle Eigenschaften der Familie *Campylobacteriaceae*

2.3.1 Bakterienmorphologie

Campylobacter spp. sind Gram-negative, schlanke, gelegentlich auch gerade, meist komma- bis S- oder V- förmige, gebogene oder spiralig gewundene, nicht sporenbildende Stäbchen. Es können eine oder mehrere helikale Windungen auftreten. Auch die Bildung kurzer Ketten kann vorkommen. Durch den Besitz von monotrichen, manchmal auch polytrichen polaren oder bipolaren unbewüllten Geißeln an den spitz zulaufenden Enden (Abb. 2) besitzen sie die charakteristische Eigenschaft der oszillierenden oder korkenzieherartigen Beweglichkeit (SMIBERT, 1984; URSING et al., 1994). Je nach Spezieszugehörigkeit haben *Campylobacter* eine Größe von 0,2-0,5 µm Breite und 0,5-8,0 µm Länge.

Während der frühen logarithmischen Wachstumsphase treten vor allem kurze, stark bewegliche Organismen auf. In reiferen Kulturen befinden sich dagegen vermehrt längere, weniger motile Formen (SMIBERT, 1978; PEAD, 1979; SKIRROW und BENJAMIN, 1980b). In sehr alten Kulturen können sphärische oder kokkoide Formen nach längerer Bebrütung oder Lagerung (> 48 h) auftreten (SMIBERT, 1978).

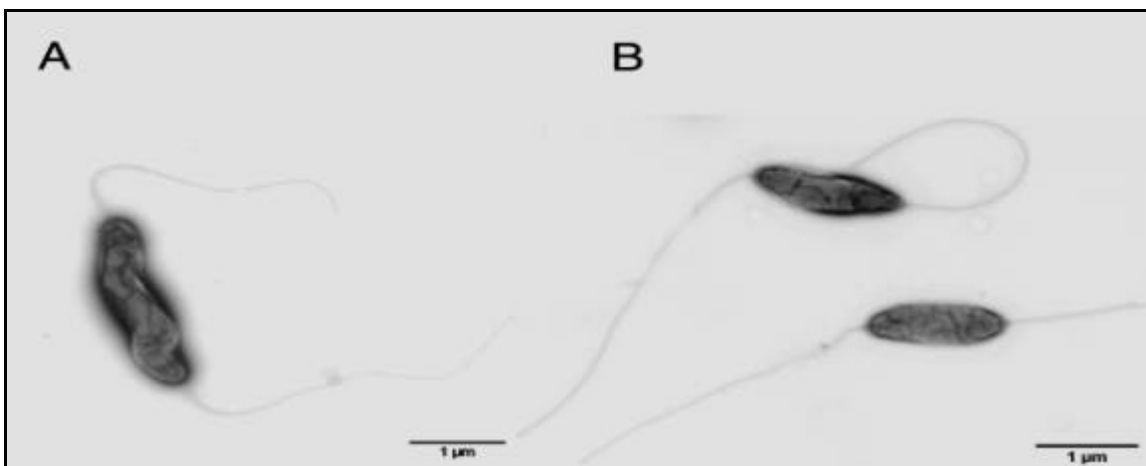


Abb. 2: Morphologie von *C. jejuni* (A, B) mit bipolarer Begeißelung (Aufnahmen im Transmissionselektronenmikroskop; Negativkontrastierung mit Uranylacetat; Quelle: Dr. Reetz, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin)

2.3.2 Koloniemorphologie

In der Primärkultur wachsen thermophile *Campylobacter* spp. in zwei Wuchsformen, abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt und Alter des Nährbodens sowie von den Anzuchtsbedingungen.

Bei hohem Anteil an Feuchtigkeit im frischen Nährmedium besteht aufgrund der Beweglichkeit eine Tendenz zum Schwärmen und Zusammenfließen. Es entstehen flache, unregelmäßig geformte, grau glänzende Kolonien mit glatter Oberfläche.

Ein zweiter Typ wird auf älteren, trockenen Nährböden angetroffen. Diese Einzelkolonien sind meist klein (\varnothing 1-2 mm), rund, flach bis konvex, ungliedert, glatt, leicht mukoid und grau glänzend (WANG et al. 1978; SKIRROW und BENJAMIN, 1980b).

Die Färbung der Kolonien variiert von einem unpigmentierten über ein gelbbräunliches, bis hin zu einem grau metallisch glänzenden Aussehen. Bei Wachstum auf Blutagar ist keine Hämolyse nachweisbar (NACHAMKIN et al., 2000). Die Keime auf der Platte sind geruchlos.

2.3.3 Physiologische und kulturelle Eigenschaften

Campylobacter spp. sind obligat mikroaerophil mit respiratorischem Stoffwechsel. Die Sauerstofftoleranz kann zwischen den Spezies und Stämmen variieren. Optimale Gasgemische zur Kultivierung enthalten 5% O₂, 5-10% CO₂ und 85-90% N₂ (THOMPSON et al., 1990; HUNT et al., 2001). Im Gegensatz zu erhöhten Sauerstoffgehalten sind Kohlendioxidgehalte zwischen 5 bis 10% in der Atmosphäre von Vorteil. Diese Eigenschaft wird auch als capnophil bezeichnet (SMIBERT, 1978). Vermutlich ist die Mikroaerophilie auch ein Resultat der Adaption von *Campylobacter* spp. an die atmosphärischen Zustände im Darm von warmblütigen Tieren und Vögeln (KETLEY, 1997; PARK, 2002).

Die metabolische Aktivität von *Campylobacter*-Spezies ist schwach: Alle bisher bekannten *Campylobacter*arten sind „asaccharolytisch“, d.h. sie verwerten Kohlenhydrate weder fermentativ noch oxidativ (VANDAMME und DE LEY, 1991). Die Energie wird aus organischen Säuren wie Succinat, Fumarat, Lactat und Malat (Zwischenprodukte des Tricarbonsäure-Zyklus) und aus dem Abbau von Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat und Serin bezogen (ELKARRIF und

MEGRAUD, 1986). Eisen wird ebenfalls von *Campylobacter* spp. als essentieller Nährstoff benötigt (PARK, 2002). Sie sind auch in der Lage, Hämin und Hämoglobin des Wirtes zu verwerten (PICKETT et al., 1992).

Die optimale Temperatur für die Vermehrung von thermophilen *Campylobacter* spp. beträgt +42°C bis +43°C (SKIRROW und BENJAMIN, 1980b). Des Weiteren sind pH-Werte von 6,5-7,5 und a_w -Werte um 0,997 günstig für eine Vermehrung (Tab. 1).

Wie bei anderen Gram-negativen Bakterien besteht die äußere Membran bei *C. jejuni* aus Lipopolysacchariden (LPS). Allerdings werden häufiger Lipooligosaccharide (LOS) und seltener komplette Lipopolysaccharide gefunden (FRY et al., 1998). In ihrer Antigenstruktur sind *Campylobacter* spp. sehr heterogen. *C. jejuni* und *C. coli* besitzen thermostabile O-Antigene, bestehend aus Lipopolysacchariden, sowie thermolabile Flagellen (H)- und Kapsel (K)-Antigene (FISCHER, 1992).

2.4 Tenazität

2.4.1 Temperatur

Thermophile *Campylobacter* spp. benötigen für optimales Wachstum und Vermehrung eine Temperatur von +42°C, das Maximum liegt bei +45°C und das Minimum bei +32°C (MORRIS und PATTON, 1985; Tab. 1). Das Wachstum bei +42°C ist möglicherweise eine Anpassung an die Temperatur, welche in ihrem normalen Lebensraum (dem Intestinaltrakt von warmblütigen Tieren, insbesondere von Vögeln) vorliegt (KETLEY, 1997).

Außerhalb des Tierkörpers und unterhalb von +30°C findet keine Vermehrung statt, wobei die Ursache hierfür möglicherweise in der fehlenden Produktion von Kälteschockproteinen liegt (PARKHILL et al., 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen Lebensmittelinfektionserregern vermehren sich *Campylobacter* spp. daher in der Regel nicht in Lebensmitteln, die bei Kühl- oder Raumtemperaturen behandelt bzw. gelagert werden (BLANKEN-SHIP und CRAVEN, 1982; HAZELEGER et al., 1998; JACOBS-REITSMA, 2000; PARK, 2002). Generell erhöht sich die Umwandlungsrate zu nichtkultivierbaren Formen mit fallenden Temperaturen.

In Temperaturbereichen zwischen +10°C und +30°C kommt es zum langsamen Absterben der Keime (GILL und HARRIS, 1983; ABRAM und POTTER, 1984).

Besonders kritische Temperaturen liegen im Bereich von +16°C bis +22°C (TERZIEVA und MCFETERS, 1991; THOMAS, 1997). Die Temperaturempfindlichkeit basiert möglicherweise auf Unterschieden im Fettsäuremuster und der intrazellulären ATP-Konzentration der Keime (HAZELEGER et al., 1995).

Verschiedene in vitro-Studien haben gezeigt, daß *C. jejuni* und *C. coli* bei Kühltemperaturen eine bessere Überlebensfähigkeit besitzen als bei Raumtemperaturen (ROLLINS und COLWELL, 1986; THOMAS und MABEY, 1996; BUSWELL et al., 1998). So konnten in Untersuchungen von +4°C kaltem Flußwasser *Campylobacter* spp. in Größenordnungen bis maximal 10⁴ KbE/ml noch nach mehr als 4 Monaten nachgewiesen werden (ROLLINS und COLWELL, 1986). In ähnlichen Versuchen überlebte *C. jejuni* im Oberflächenwasser bei +4°C bis zu 4 Wochen, während bei +25°C nach 2-4 Tagen keine Isolierung mehr möglich war (BLASER et al., 1980c). Auch im Geflügelfleisch überlebten die Keime nur 3 Tage bei Temperaturen von +25°C. Dagegen konnten sie nach einer Woche bei +4°C nachgewiesen werden (WUNDT und KASPER, 1982). Auch *C. coli* und *C. lari* zeigten in anderen Untersuchungen eine ähnliche Temperaturempfindlichkeit wie *C. jejuni*. Die Überlebensfähigkeit der Keime in Meer- und Flußwasser war bei +4°C gegenüber Temperaturen von +10°C, +20°C und +37°C am längsten (OBIRI-DANSO et al., 2001). *C. jejuni* zeigte in einer +4°C kalten Umgebung noch eine metabolische und respiratorische Aktivität, ATP-Produktion sowie Beweglichkeit (HAZELEGER et al., 1998).

Ein Überleben der Keime unter Gefriertemperaturen, u.a. in Geflügelprodukten, ist ebenfalls möglich (KAIJSER und SVEDHEM, 1982; FERNÁNDEZ und PISÓN, 1996). Ein Nachweis gelang nach mehr als drei Monaten bei -20°C (BLASER et al., 1980a; ALTMAYER et al., 1985; GENIGEORGIS et al., 1985). Allerdings reduziert sich unter solchen Umständen die Isolierungshäufigkeit sowie die Zahl vermehrungsfähiger Keime (BLANKENSHIP und CRAVEN, 1982; ALTMAYER et al., 1985; HUMPHREY und CRUICKSHANK, 1985). Auf einer Geflügelkarkasse, welche bei -18°C für 4 Wochen gelagert wurde, erfolgte eine Keimreduzierung um 2 log₁₀-Stufen (AHO und HIRN, 1988).

Zum raschen Absterben führen dagegen Pasteurisierungsverfahren oder Abkochen (SHANE, 2000; ANONYMUS, 1998). Temperaturen von +52°C bis +60°C wirken wachstumshemmend mit D-Werten für *C. jejuni/coli* von 0,21-2,25 Minuten (ANONYMUS, 1998). In Untersuchungen auf Wärmetoleranz der

Keime reduzierte sich die Bakterienzahl bei +55°C um eine Zehnerpotenz in einer Minute (DOYLE und ROMAN, 1981). Unter Hitzeeinwirkung von +60°C überlebte nach einer Dauer von 15 Minuten keiner der geprüften Stämme (SVEDHEM et al., 1981; SLAVIK et al., 1995).

C. jejuni/coli können jedoch auf wechselnde Umgebungstemperaturen (Geflügeldarm [42°C], Menschen [37°C], Umwelt [< 20°C]) reagieren. Hierzu bedienen sie sich unterschiedlicher Temperaturregulations- und Hitzeschockproteine (KONKEL et al., 1998; THIES et al., 1998, 1999a, 1999b; PARKHILL et al., 2000).

2.4.2 pH-Wert

Gutes Wachstum und Vermehrung von *Campylobacter* spp. findet bei pH 5,5 bis 8,0 mit einem Optimum von pH 6,5-7,5 statt (DOYLE und ROMAN, 1981). Ein Überleben ist zwischen pH 4,9-9,0 möglich (ANONYMUS, 1995a; Tab. 1). Unterhalb von pH 4,7-4,9 kommt es je nach Stamm zur Inaktivierung bis hin zum Absterben der Keime (DOYLE und ROMAN, 1981; BLASER et al., 1980c). Bei pH-Werten < 4,5 hängt die Geschwindigkeit, mit der die Bakterien zugrunde gehen, von der Temperatur ab. Je höher die Temperatur bei einem niedrigen, das Wachstum hemmenden pH-Wert ist, desto schneller erfolgt die Inaktivierung (DOYLE und ROMAN, 1981; SMIBERT, 1981). Unter pH 3,0 nimmt die Zahl der vermehrungsfähigen Keime rapide ab (BLASER et al., 1980c). In Lebensmitteln mit niedrigem pH-Wert betrug die Überlebenszeit nur wenige Stunden (WUNDT et al., 1985; SIMANGO und RUKURE, 1992).

2.4.3 Wasseraktivität und Abtrocknung

Campylobacter spp. sind sehr sensibel gegenüber Trockenheit (v.a. bei Raumtemperatur) und überleben daher schlecht auf trockenen Oberflächen (SMIBERT, 1981; DOYLE und ROMAN, 1982c; FERNÁNDEZ et al., 1985). Der minimale a_w -Wert für die Vermehrung thermophiler *Campylobacter* spp. liegt bei > 0,987, der optimale bei 0,997 (Tab. 1).

Lebensfähige Keime lassen sich nur von glatten Oberflächen isolieren, solange diese feucht sind (DOYLE und ROMAN, 1982a). Untersuchungen im Schlachthof haben gezeigt, daß *C. jejuni* nur auf feuchten Oberflächen

überlebte (OOSTEROM et al., 1983b). Auf optisch trockenen Oberflächen war eine Isolierung nicht mehr möglich. Mit sinkender Oberflächenfeuchtigkeit auf Muskulatur und Organen nimmt die Überlebensdauer von *C. jejuni* ab. In der Schlachtung konnte beim Geflügel eine Reduzierung von *C. jejuni* auf der Haut nach der Luftkühlung beobachtet werden. Ursache war vermutlich der Trocknungsprozeß (OOSTEROM et al., 1983a).

Die Kombination aus Temperatur und Luftfeuchtigkeit scheint eine wichtige Rolle für das Überleben der Keime zu spielen. Niedrige Temperaturen (+4°C) und hohe Luftfeuchtigkeit begünstigen, erhöhte Temperatur (+25°C) und geringe relative Luftfeuchtigkeit vermindern das Überleben der Keime (DOYLE und ROMAN, 1982c).

2.4.4 NaCl-Empfindlichkeit

Im Gegensatz zu anderen enteropathogenen Gram-negativen Bakterien sind *C. jejuni/coli* relativ empfindlich gegenüber NaCl. Konzentrationen von 2,0% können zu einer Wachstumshemmung führen (HÄNNINEN, 1981; DOYLE und ROMAN, 1982a; ANONYMUS, 1995a; Tab. 1).

Die NaCl-Toleranz der einzelnen *Campylobacter*-Spezies ist jedoch unterschiedlich und abhängig von der Umgebungstemperatur. *C. lari* toleriert beispielsweise Kochsalzgehalte von 2,5% (DOYLE und ROMAN, 1982a). In Versuchen von SMIBERT (1981), DOYLE und ROMAN (1982a) sowie HÄNNINEN (1982) überlebten *Campylobacter*-Keime höhere NaCl-Konzentrationen im Nährmedium bei +4°C eher als bei +25°C und +35°C. HÄNNINEN (1982) stellte fest, daß *C. jejuni* im Kulturmedium bei +30°C Anzüchtungstemperatur höhere Kochsalzgehalte tolerierte als bei +35°C. Untersuchungen von ABRAM und POTTER (1984) ergaben, daß *C. jejuni*-Stämme Kochsalzgehalte von 3% im Kulturmedium bei +6°C und +10°C Inkubationstemperatur mindestens 5 Tage überleben können, während sie nach einer Bebrütung mit +42°C nur 12 Stunden lebensfähig blieben. NaCl-Konzentrationen von 1,0% haben das Wachstum von *C. jejuni/coli* unter optimalen Inkubationstemperaturen dagegen begünstigt (HÄNNINEN, 1981).

2.4.5 Atmosphäre

Campylobacter spp. benötigen 5% O₂ und 10% CO₂ für ideales Wachstum und Vermehrung (Tab. 1). Höhere Sauerstoffgehalte wirken schädigend. 15-21% Sauerstoff in der Atmosphäre genügen, um Wachstum und Vermehrung zu verhindern (HODGE und KRIEG, 1994). Der Grund hierfür liegt in der extremen Empfindlichkeit gegenüber Peroxiden und Superoxidanionen. Superoxidradikale führen zur Schädigung von Nukleinsäuren, Proteinen und Zellmembranen (PARK, 2002). Durch Enzyme der Keime, wie die eisenhaltige Superoxid-Dismutase (PESCI et al., 1994; PURDY und PARK, 1994; PURDY et al., 1999), Alkylhydroperoxid-Reduktase (BAILLON et al., 1999) und Katalase (GRANT und PARK, 1995) besteht eine gewisse Resistenz gegenüber dem „oxidativen Stress“ (PARK, 2002).

Tab. 1: Vermehrungsgrenzen für thermophile *Campylobacter* spp. (modifiziert nach ANONYMUS, 1998)

Parameter	Minimum	Optimum	Maximum
Temperatur	32 °C	42-43°C	45°C
pH-Wert	4,9	6,5-7,5	ca. 9,0
NaCl	-	0,5 %	1,5%
aw-Wert	>0,987	0,997	-
Atmosphäre	-	5% O ₂ + 10% CO ₂	-

2.4.6 Desinfektionsmittel-Empfindlichkeit

Desinfektionsmittel, welche von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) empfohlen und in der Lebensmittelindustrie verwendet werden, gelten als wirksam gegenüber *Campylobacter* spp. Dabei wird die vollständige Inaktivierung nur bei sachgemäßer Anwendung und entsprechender Dosierung erreicht.

Die Abtötung von *C. jejuni* in Konzentrationen von 10⁵-10⁷ KbE/ml wurde bei +24°C bis +26°C und pH 7,0 innerhalb einer Minute mit Standardkonzentrationen gängiger Desinfektionsmittel (u.a. Quarternäre Ammoniumverbindungen, Glutaraldehydlösung) erreicht (WANG et al., 1983).

Zur Hemmung von Wachstum und Vermehrung können auch organische Säuren (SIMANGO und RUKURE, 1992) und Salze eingesetzt werden. Ascorbinsäure hat beispielsweise durch Bildung von Oxidationsprodukten eine

toxische Wirkung auf *C. jejuni* (JUVEN et al., 1988). Ebenso wurde Milch- oder Essigsäure als effektives Mittel zur Abtötung bzw. Reduzierung der Keime vorgeschlagen (STERN et al., 1985; EPLING et al., 1993). HWANG und BEUCHAT (1995) erzielten Erfolge in der Reduktion von *C. jejuni* auf Geflügel mit der Anwendung von Milchsäure (0,5%) in Kombination mit Natriumbenzoat (0,05%).

Die Keimvermehrung kann außerdem durch 0,1% NaCl oder Na₃PO₄ eingeschränkt werden (DOYLE und ROMAN, 1982a; GILL und HARRIS, 1984a, 1984b). LI et al. (1995) konnten durch Kombination von 10% Na₃PO₄ mit pulsierenden elektrischen Signalen (10 mA, 1 kWh, 50 Zyklen) die Brühwasserkontamination um 2 log₁₀-Einheiten senken.

Auch Chlor wurde als effektives Mittel in der Desinfektion eingesetzt (SIMMONS und GIBBS, 1979; MCNAMARA, 1994; MEAD et al., 1995). Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Abtötung von *C. jejuni* mit freiem Chlor (0,1 mg/l Wasser) und Monochloramin (1,0 mg/l Wasser) bei pH 6 möglich ist (BLASER et al., 1986). Allerdings konnte *C. jejuni* trotz Verwendung von chloriertem Kühlwasser in Geflügelschlachtbetrieben isoliert werden (WEMPE et al., 1983). Dabei überlebten die Keime je nach Chlorkonzentration und Proteingehalt des Wassers bis zu einem Tag. Vor allem die Proteine auf der Haut bieten möglicherweise einen Schutz der Bakterien vor der Chlorwirkung (PARK et al., 1981).

Die Zugabe von Chlor und ähnlichen Chemikalien zum Prozeßwasser in der Geflügelschlachtung ist z.Zt. in der Europäischen Union verboten. Das gleiche gilt für die Behandlung von Geflügelfleischprodukten mit organischen Säuren, wenn diese als Frischfleisch deklariert werden sollen.

2.4.7 UV- und Röntgenstrahlen-Empfindlichkeit

Campylobacter spp. können leicht durch ultraviolette Strahlung und γ -Strahlung inaktiviert werden. BUTLER et al. (1987) konnten nachweisen, daß *C. jejuni* empfindlicher gegenüber UV-Strahlen ist als *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica*. In anderen Untersuchungen waren *Campylobacter* spp. nach einer zehnmütigen UV-Bestrahlung nicht mehr kultivierbar (OBIRI-DANSO et al., 2001). Als problematisch gilt jedoch die Dekontamination von Schlachtkörperoberflächen beim Geflügel, da aufgrund ihrer unregelmäßigen

Beschaffenheit durch Befiederung und Federfollikel Schattenareale vorhanden sind, welche von den UV-Strahlen nicht erreicht werden können.

Neben der UV-Strahlen-Empfindlichkeit besteht bei *Campylobacter* spp. auch eine hohe Sensibilität gegenüber γ -Strahlen (LAMBERT und MAXEY, 1984; TARJAN, 1984). Untersuchungen haben gezeigt, daß *C. jejuni*-Spezies empfindlicher waren als Salmonellen (TARKOWSKI et al., 1984). Eine Bestrahlungsdosis von 2,5 kGy führte zu einer Reduzierung von *C. jejuni* auf Geflügelfleisch um $10 \log_{10}$ - Einheiten (PATTERSON, 1995).

2.4.8 Viable but non-culturable (VNC)

Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. Hitze, Kälte, Bestrahlung, Desinfektion, Nährstoffentzug und erhöhtem Sauerstoffgehalt in der Atmosphäre gehen *Campylobacter* spp. in eine kokkoide oder sphärische Form über (BUCK et al., 1983; MORAN und UPTON, 1987; BOUCHER et al., 1994; THOMAS et al., 1999). Gleichzeitig vollzieht sich eine Veränderung von einer lebensfähigen kultivierbaren (viable culturable) Form in eine lebensfähige nicht kultivierbare (viable but non-culturable) Form (ROLLINS und COLWELL, 1986). Allerdings erfolgt nicht bei allen *Campylobacter*-Stämmen diese Umwandlung (THOLOZAN et al., 1999).

In normaler Raumatmosphäre beginnt die kokkoide Transformation von *C. jejuni* bereits nach einem Tag und ist nach zwei Tagen komplett ausgebildet (KARMALI et al., 1981, 1982). Lange Inkubationszeiten haben ähnliche Effekte. Nach einer 72-stündigen Bebrütung konnten bis zu 50% kokkoide *Campylobacter* spp. festgestellt werden (PEAD, 1979). Eine Vermehrungsfähigkeit ist meist nicht mehr vorhanden (SKIRROW und BENJAMIN, 1980b).

Der genaue Sinn und Zweck der VNC-Form ist noch nicht geklärt. Es wurde vermutet, daß sie möglicherweise ein Stadium der Degeneration durch Abnahme der verfügbaren Nährstoffe darstellt (BUCK et al., 1983, THOLOZAN et al., 1999). In verschiedenen Studien konnten bei *Campylobacter* spp. im kokkoiden Stadium Verluste von Nukleinsäuren und Peptiden nachgewiesen werden (MORAN und UPTON, 1987; BEUMER et al., 1992; BOUCHER et al., 1994). HAZELEGER et al. (1995) stellten bei *C. jejuni* eine Reduzierung von intrazellulärer ATP-Konzentration mit gleichzeitiger Erhöhung von extrazellulärem ATP während des Frühstadiums fest. Dieses spricht für eine

Beschädigung der Zellen. MERRELL et al. (1981) konnten jedoch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine degenerierten Zellen finden. Daher könnte diese morphologische Veränderung auch einen Schutzmechanismus für das Überleben in ungünstigen Lebensräumen darstellen (HUQ und COLWELL, 1996).

Die Möglichkeit einer Wiederbelebung bzw. Wiederherstellung der ursprünglichen Form wurde anhand verschiedener Tiermodelle gezeigt (SAHA et al., 1991; PEARSON et al., 1993). Die Diskussion, ob das VNC-Stadium eine infektiöse Form für das Geflügel oder andere Tiere darstellt wird weitgehend kontrovers geführt (JONES et al., 1991b; MEDEMA, et al., 1992; STERN et al., 1994).

2.5 Antibiotikasensibilität

Tierische Stämme von *C. jejuni* haben eine hohe Sensibilität gegen Erythromycin, Chloramphenicol, Clindamycin und Gentamicin. Schwache bis mäßige Resistenzen bestehen bei *C. jejuni/coli* gegen Cephalothin, Ampicillin, Streptomycin und Tetrazyklinen (TAYLOR et al., 1983; TENOVER et al., 1985; ALTMAYER et al., 1986).

Bei der Auswahl der Therapeutika ist die zunehmende Resistenzentwicklung gegen Chinolone, aber auch, vor allem bei *C. coli*, gegen Makrolide zu berücksichtigen. *C. coli*-Stämme sind im Vergleich zu *C. jejuni*-Stämmen resistenter gegenüber Erythromycin (SAGARA et al., 1987; ENGBERG et al., 2001). Trotzdem ist Erythromycin bei der Therapie von *Campylobacter*-Infektionen des Menschen das Mittel der Wahl (VANHOOF, 1984).

Gegenüber Nalidixinsäure konnten zunehmende Resistenzen ermittelt werden. Untersuchungen von Lebensmittelisolaten aus Geflügel- und Innereienproben, welche im Handel genommen wurden, ergaben Nalidixinsäure-Resistenzen von 38,8% (THURM und DINGER, 1993).

Eine zunehmende Resistenz von *C. jejuni*-Isolaten von Mensch und Geflügel gegenüber Chinolonen konnte im Zusammenhang mit dem exzessiven Einsatz von Enrofloxacin in der Geflügelmast in den Niederlanden festgestellt werden. In den Jahren 1982 bis 1989 stieg die Chinolonresistenz bei menschlichen Isolaten von 0% auf 11,5%. Im gleichen Zeitraum erhöhten sich die Resistenzraten beim Geflügel von 0,5% auf 14% (ENDTZ et al., 1991). Bei Untersuchungen in

Spanien in den Jahren 1997/98 wurden Resistenzen gegen Fluorochinolone von 75% festgestellt (SÁENZ et al., 2000).

Sehr hohe Resistenzraten bestehen auch gegen Sulfonamide, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und gegen Penicilline (BRADBURY und MUNROE, 1985; ALTMAYER et al., 1986).

2.6 Probenentnahme und Probentransport

Für die Probenentnahme im Geflügelmastbetrieb zur Untersuchung auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. sind Tupfer von frisch abgesetzten Kot geeignet, da die Kolonisationsrate zwischen 10^5 - 10^9 KbE/g Faeces betragen kann (ALTMAYER et al., 1985; AHO et al., 1988; BERNDTSON et al., 1992). Bei der Entnahme von Kottupfern ist darauf zu achten, daß lediglich frisch abgesetzter Blinddarmkot (dunkler Kotanteil) betupfert wird und kein Harn wegen der bakteriziden Wirkung der Harnsäure aufgenommen wird. In der Regel werden mindestens 5-10 Kottupfer pro Herde genommen, um eine Belastung mit *Campylobacter* spp. in der Mast festzustellen (JACOBS-REITSMA et al., 1995b; VAN DE GIESSEN et al., 1996). Die Beprobung sollte ca. eine Woche vor Ausstellung erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt bei *Campylobacter*-befall einer Herde mit einer hohen Infektionsrate zu rechnen ist (ALTMAYER et al., 1985; LINDBLOM et al., 1986; JACOBS-REITSMA et al., 1995b; JAKOBS-REITSMA, 1997).

Für die Probenentnahme auf dem Schlachthof am Tierkörper oder bei Umgebungsuntersuchungen eignen sich sterile Einmaltupfer. Prozeßflüssigkeiten sollten nach Entnahme in sterile Aufbewahrungsbehälter überführt werden. Zum *Campylobacter*-Nachweis in Lebensmittel- und Wasserproben sind die üblichen Anforderungen der Probenentnahme für die mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung zu berücksichtigen.

Aufgrund der Empfindlichkeit von *Campylobacter* spp. gegenüber Austrocknung, Raumtemperaturen, hohen Sauerstoffgehalten, niedrigen pH-Werten und unerwünschter Begleitflora ist für die Lagerung von Proben bis zum Aufarbeiten im Labor ein Transportmedium notwendig, um falsch negative Resultate auszuschließen (AHO et al., 1988). Als geeignetes Medium für Transport und Lagerung von Proben mit *Campylobacter* spp. hat sich modifiziertes Cary-

Blair-Medium erwiesen (LUECHTEFELD et al., 1981; AHO et al., 1988; OYARZABAL et al., 1995).

Die Proben sollten gekühlt (ca. +4°C) und dunkel gelagert innerhalb von 24 Stunden zum Labor transportiert werden (ALTEKRUSE et al., 1999). Dabei ist eine Lagerung in luftdichten Behältern von Vorteil.

2.7 Isolierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp.

2.7.1 Isolierung von thermophilen *Campylobacter* spp.

Die Isolierung erfolgt über den Einsatz von Selektivmedien unter Ausnutzung des Temperaturverhaltens, der Mikroaerophilie sowie der Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika von thermophilen *Campylobacter* spp.

Zur Isolierung aus Untersuchungsmaterial mit viel Begleitflora, besonders aus Fäzesproben, eignen sich feste bluthaltige oder blutfreie und stattdessen kohlehaltige Nährböden mit verschiedenen Hemmstoff-Supplementierungen (KIST, 1991; ANONYMUS, 1993) (Tab. 2). Als Schutz vor toxischen Sauerstoffderivaten (Peroxide, Superoxidationen) und zum Erhöhen der Aerotoleranz wird für die Basis der Nährböden u.a. lysiertes oder defibriniertes Pferdeblut bzw. defibriniertes Schafblut (5-15%), FBP (Eisensulfat, Natriummetabisulfit, Natriumpyruvat) oder Kohle mit den Zusätzen Hämin oder Hämatin verwendet. Diesen nichtselektiven Nährbodengrundlagen werden zur Unterdrückung von Begleitflora antimikrobiell wirksame Substanzen wie z.B. Amphotericin B, Bacitracin, Cefalotin, Cefalozin, Colistin, Novobiocin, Polymyxin B, Rifampicin, Trimethoprim und Vancomycin zugesetzt. Gut geeignet für *Campylobacter* spp.-Isolierungen sind auch Cefoperazon enthaltende Medien (KIST, 1991, NACHAMKIN, 1999). Eine kombinierte Verwendung von mehreren Selektivmedien mit unterschiedlicher Selektivität kann die Isolierungsrate verbessern. Vergleichsuntersuchungen von Selektivnährböden im Hinblick auf Isolierung von *Campylobacter* spp. aus Faeces sowie Unterdrückung von Begleitflora haben gezeigt, daß die kohlehaltigen Karmali- und mCCD-Agars den bluthaltigen Nährböden überlegen waren (GUN-MUNRO et al., 1987; GRIFFITHS und RIBEIRO, 1988; MÜLLER und MÜLLER, 1997).

Neben der Verwendung von Nährböden ist eine selektive Anreicherung in flüssigen Nährmedien empfehlenswert bei Untersuchungsmaterial mit hoher Begleitflora und/oder geringer Anzahl an *Campylobacter* spp., welche

möglicherweise auch in ihrer Vermehrungsfähigkeit beeinträchtigt oder subletal geschädigt sind (STEELE und MCDERMOTT, 1984; NACHAMKIN, 1999) (Tab. 2). Hier haben sich die Medien nach Bolton, Hunt und die CEB (*Campylobacter* Enrichment Broth) bewährt (HUNT et al., 2001; ANONYMUS, 2002). Gut geeignet ist auch die Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon, welche Zusätze reduzierender Substanzen wie Eisenbisulfat, Natriumdisulfit sowie Natriumpyruvat enthält (HUTCHINSON und BOLTON, 1983). Sie sollen die Sauerstofftoleranz der *Campylobacter* spp. erhöhen. Antibiotikazusätze wie Poli- und Amphotericin B gegen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae* sowie Cycloheximid gegen Schimmelpilze und Hefen sind zur Unterdrückung von Begleitflora wirksam. Ansonsten werden aber auch Cefoperazon, Methoprim, Rifampicin und Vancomycin in unterschiedlichen Kombinationen mit Zusatz von Blut oder Kohle verwendet (CORRY et al., 1995).

Im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen wird bei besonderen Fragestellungen die Membranfilter-Methode zur Isolierung von *Campylobacter* spp. aus keimreichen Materialien eingesetzt (DEKEYSER et al., 1972; STEELE und MCDERMOTT, 1984). Diese Methode ermöglicht die Isolierung von Spezies, welche durch die in den Selektivmedien enthaltenen Hemmstoffe unterdrückt werden und somit dem Nachweis entgehen. Die Durchführung der Methode ist bei CORRY et al. (1995) und NACHAMKIN (1999) beschrieben.

Die Bebrütung thermophiler *Campylobacter* spp. sowohl in Anreicherungen als auch auf Nährböden muß in mikroaerober Atmosphäre mit ca. 5% O₂, 10 % CO₂ und 85% N₂ erfolgen (BOLTON und COATES, 1983; THOMPSON et al., 1990; SCHULZE et al., 2000). Für die Erzeugung einer solchen Atmosphäre können kommerziell erhältliche Gasentwicklerkits in Kombination mit Anaerobiertöpfen oder begasbare Brutschränke verwendet werden. Die Inkubationsdauer reicht von 24 bis 72 Stunden, liegt im Normalfall jedoch bei 48 Stunden (ANONYMUS, 1995b) bei einer optimalen Bebrütungstemperatur von +42°C (SKIRROW und BENJAMIN, 1980b). Diese Temperatur bewirkt zusätzlich eine Hemmung der Begleitflora. Neuere Untersuchungen haben aber auch gezeigt, daß bei subletal geschädigten Bakterien eine Voranreicherung bei +37°C mit nachfolgender Inkubation bei +42°C bessere Ergebnisse liefern (ATANASSOVA und RING, 2000). Für die Nährmedien werden pH-Werte zwischen 7,0 und 7,5 empfohlen (BUTZLER et al., 1983).

Tab. 2: Nähr- und Anreicherungsmedien für die Isolierung von *Campylobacter* spp. (modifiziert nach CORRY et al., 1995)

Nährmedien	Autor
1. bluthaltig	
Blaser-Wang	Blaser et al., 1980c
Butzler	Lauwers et al., 1978
Campy BAP	Blaser et al., 1978
Preston-Agar	Bolton und Robertson, 1982; Baird et al., 1987
Skirrow	Skirrow, 1977; Baird et al., 1987
2. blutfrei	
Karmali-Agar	Karmali et al., 1986
mCCD-Agar	Bolton et al., 1984a, mod. nach Hutchinson und Bolton, 1984; Baird et al., 1987
Anreicherungsmedien	Autor
Doyle und Roman Bouillon	Doyle und Roman, 1982b
Exeter Bouillon	De Boer und Humphrey, 1991
Hunt und Radle Bouillon	Hunt, 1992
mCCD Bouillon	Bolton et al., 1984a; mod. nach Hutchinson und Bolton, 1984
Park und Sanders Bouillon	Park und Sanders, 1991
Preston Bouillon	Bolton et al., 1982; Baird et al., 1987
VTP FBP Bouillon	Lovett et al., 1983; mod. nach Park et al., 1981

2.7.2 Phänotypische Differenzierung

Neben der Beurteilung von Koloniemorphologie, Beweglichkeit sowie Wachstum von thermophilen *Campylobacter* spp. bei +43°C und +25°C erfolgt die phänotypische Spezieszuordnung über kulturelle und biochemische Differenzierungen. Es werden drei Arten von Tests zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. durchgeführt. Zu den grundlegenden Verfahren gehören die Bestimmung der Wachstumstemperaturgrenzen, biochemische Tests zur Prüfung der Stoffwechselaktivitäten und Toleranztests gegenüber chemischen und antimikrobiellen Verbindungen. Von VANDAMME und GOOSSENS (1992) werden für die Identifizierung und Differenzierung von *Campylobacter* spp. folgende Prüfverfahren vorgeschlagen:

Katalase-Reaktion, Oxidase-Reaktion, Nitrat- und Nitrit-Reduktion, H₂-Bedarf, Urease-Test, H₂S-Produktion, Hippurathydrolyse, Indoxyl-Acetat-Hydrolyse,

Wachstumsverhalten bei +15°C, +25°C und +42°C sowie Sensibilität gegenüber Nalidixinsäure und Cephalothin. Darüber hinaus werden als weitere Unterscheidungskriterien das Wachstum unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von 0,1% TMAO (Trimethylamin-N-oxal-Hydrochlorid), die Toleranz gegenüber 3,5% NaCl und 1% Glyzin sowie das Wachstum unter aeroben Bedingungen in Betracht gezogen. In der Tab. 3 sind die derzeit gültige Klassifizierung und die wichtigsten biochemischen Eigenschaften des Genus *Campylobacter* zusammengefaßt.

Hauptgegenstand der Untersuchung in der vorliegenden Arbeit waren *C. jejuni* und *C. coli*, welche als thermophile *Campylobacter* spp. bei +42°C, nicht aber bei +25°C wachsen. Beide Spezies lassen sich lediglich durch die Hippurathydrolyse biochemisch unterscheiden, zu der nur *C. jejuni* fähig ist (HARVEY, 1980; SKIRROW und BENJAMIN, 1980b). Dennoch kann mit dieser Methode keine absolut sichere Aussage über die Spezies getroffen werden. Über das Auftreten von *C. jejuni*-Stämmen, bei denen die als spezifisch angesehene Hippurathydrolyse nicht nachgewiesen werden konnte, wurde berichtet (HEBERT et al., 1984; TOTTEN et al., 1987). Es wurde auch festgestellt, daß *C. jejuni*-Stämme die Fähigkeit zur Hippuratspaltung nach einigen Passagen verlieren können, wodurch die biochemische Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* erschwert wird (BÄR und FRICKE, 1987). Im Vergleich von phänotypischen und genotypischen Differenzierungsmethoden konnten biochemisch als *C. coli* identifizierte Stämme mittels PCR und PCR-RFLP als hippuratnegative *C. jejuni*-Stämme identifiziert werden (RAUTELIN et al., 1999; STEINBRUECKNER et al., 1999).

Neben der Hippurathydrolyse wird auch die Antibiotikasensibilität gegenüber Nalidixinsäure als Differenzierungskriterium eingesetzt. Hiermit konnten *C. jejuni* und *C. coli* z.B. gegen *C. lari* abgegrenzt werden. Aufgrund der in den letzten Jahren beobachteten Zunahme von Fluorochinolon-Resistenz bei *Campylobacter*-Stämmen ist eine Differenzierung anhand der Nalidixinsäuresensibilität nur noch begrenzt möglich (ENDTZ et al., 1991; TENOVER et al., 1992; PIDDOCK, 1995). In letzter Zeit wurden vermehrt Nalidixinsäure-resistente Stämme von *C. jejuni* nachgewiesen (JAKOBS-REITSMA et al. 1994a; GEILHAUSEN et al., 1995).

Tab. 3: Kulturelle und biochemische Differenzierung der *Campylobacter* spp. (modifiziert nach VANDAMME und GOOSSENS, 1992)

Spezies	Hydrolyse		Kat.	Reduktion		H ₂ - Bedarf	Wachstum			H ₂ S (TSI)	Empfindlichkeit		
	Hippurat	Indoxyl- Acetat		Nitrat	Nitrit		25°C	43°C	NaCl 3,5%		Glycin 1%	Nalidixin- säure	Cepha- lothin
<i>C.jejuni</i> spp. <i>jejuni</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	s	r
<i>C.jejuni</i> spp. <i>doley</i>	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	s	s
<i>C.coli</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+/-	s	r
<i>C.lari</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	r	r
<i>C.upsaliensis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+/-	-	s	s
<i>C.fetus</i> <i>veneralis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	r	s
<i>C.sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	s	s
<i>C.sputorum</i> subsp. <i>bulbus</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	r	s
<i>C.hyointestinalis</i>	-	-	+	+	-	+/-	+	+	-	+	+	r	s
<i>C.conciscus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	r	r
<i>C.curvus</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	s	s
<i>C.mucosalis</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	r	s
<i>C.rectus</i>	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	s	k.A.
<i>C.helveticus</i>	-	+	-	+	k.A.	-	-	+	k.A.	+/-	-	s	s
<i>C.showae</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+/-	+	r	s
<i>C.hyoilei</i>	-	k.A.	+	+	+	-	k.A.	+/-	-	+	+	s	r

-: negative Reaktion; +: positive Reaktion; +/- : variable Reaktion; k.A.: keine Angaben; s.: sensibel; r.: resistent; *C.*: *Campylobacter*; Kat.: Katalase; TSI: Triple Sugar Iron Agar

2.7.3 Genotypische und phänotypische Identifizierungs- und Differenzierungsmethoden

In den letzten 20 Jahren wurden ca. 35 Methoden oder Modifikationen von vorhandenen Methoden für die Differenzierung von Stämmen innerhalb der Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* angewendet. Man unterscheidet dabei zwischen genotypischen und phänotypischen Verfahren (NACHAMKIN et al., 2000; NEWELL et al., 2000).

2.7.3.1 Notwendigkeit einer Typisierung

Die Typisierung von Erregerstämmen kann präzise Informationen über Herkunft und Übertragungswege der Keime liefern. Dies ist notwendig bei Ausbruchs- und Verfolgsuntersuchungen. Typisierungsverfahren differenzieren Stämme der gleichen Spezies. Bei epidemiologisch verwandten Isolaten einer Spezies wird davon ausgegangen, daß diese durch klonale Expansion von einem einzigen Ausgangsisolat entstanden sind und Charakteristika aufweisen, die sie von epidemiologisch nicht verwandten Isolaten unterscheiden. Zur Zeit gibt es kein optimales Typisierungsverfahren.

Als Evaluationskriterien für eine Typisierungsmethode gelten die Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit. Die Typisierbarkeit ist die Fähigkeit des Systems, klare und eindeutig interpretierbare Ergebnisse für die untersuchten Isolate zu erbringen. Die Reproduzierbarkeit ist die Leistungsfähigkeit der Methode, bei wiederholter Testung desselben Stammes gleiche Resultate zu liefern. Die Diskriminierungsfähigkeit besteht in der Eigenschaft, nicht miteinander verwandte Stämme (genetisch unabhängig) eindeutig zu differenzieren. Bei einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5%, daß zwei miteinander nicht verwandte Stämme dem gleichen Typ zugeschrieben werden, kann eine Methode in der Praxis als geeignet für statistische Anwendungen betrachtet werden. Je höher die Diskriminierungsfähigkeit, desto besser kann die Methode kleinste oder weniger häufige Variationen differenzieren. Unterscheiden sich die Ergebnisse von zwei Stämmen (unterschiedliche Typenzuordnung), geht man im allgemeinen davon aus, daß diese auch nicht miteinander verwandt sind. Dagegen ist die Entscheidung, ob zwei Stämme desselben Typs identisch sind oder demselben Klon angehören, von der Diskriminierungsfähigkeit der verwendeten Methode und der

genetischen Variabilität der Population der untersuchten Stämme abhängig. Bei sehr hoher Diskriminierungsfähigkeit können auch kleinste genetische Variationen (z.B. spontane Mutationen), welche im Verlauf einer Epidemie oder Infektion vorkommen, aufgedeckt werden. Daher ist das Konzept der Klonalität mit Vorsicht zu betrachten. Die Zuordnung sollte in solchen Fällen in Typen und Untertypen erfolgen.

2.7.3.2 Phänotypische Nachweismethoden

Phänotypische Methoden beruhen z.T. auf biochemischen Reaktionen sowie auf verschiedenen Wachstumsparametern und Resistenzprofilen. Diese Methoden sind jedoch für die eindeutige Differenzierung zwischen Stämmen einer Spezies nicht ausreichend, da viele Reaktionen instabil sind und stark variieren können (schlechte Reproduzierbarkeit).

Ein genaueres phänotypisches Verfahren stellt die Serotypisierung dar. Sie basiert auf dem Nachweis antigener Determinanten auf der Bakterienzelloberfläche mit sowohl poly- als auch monoklonalen Antikörpern. Eine Vielzahl von Oberflächenstrukturen wie Lipopolysaccharide oder Membranproteine zeigen antigene Variationen innerhalb einer Bakterienspezies und erlauben somit eine Differenzierung. PENNER und HENNESSY (1980) haben ein Verfahren für die Bestimmung von hitzestabilen Oberflächenantigenen (HS-System) mittels passiver Hämagglutination entwickelt, während LIOR et al. (1982) hitzelabile Oberflächenantigene (HL-System) mittels Objektträgeragglutination zur Differenzierung einsetzten. Die Serotypisierung nach PENNER hat sich jedoch in ihrer Anwendung durchgesetzt (JAKOBS-REITSMA et al., 1995a). Zur Zeit werden 66 Serotypen nach diesem System bestimmt (MCKAY et al., 2001). Allerdings ist die Serotypisierung für epidemiologische Untersuchungen nicht optimal geeignet, da Kreuzreaktionen zwischen Antiseren auftreten können, bei denen *Campylobacter*-Isolate mit mehreren verschiedenen Antiseren agglutinieren können (PRESTON und PENNER, 1989). Hinzu kommt, daß sich einige Stämme mit Hilfe der Serologie nicht typisieren lassen oder deren Typisierung infolge von Antigenvariationen instabil ist (PATTON und WACHSMUTH, 1992; NIELSEN et al., 1997; MCKAY et al., 2001). Ein weiterer Nachteil ist auch das Fehlen von kommerziell erhältlichen Antiseren.

Neben der HS-Serotypisierung sind noch die Phagentypisierung (GRAJEWSKI et al., 1985; SALAMA et al., 1990) und Biotypisierung (BOLTON et al., 1984b) im Gebrauch. Andere phänotypische Methoden wie z.B. die Resistotypisierung und Auxotypisierung haben sich nicht durchsetzen können.

Ein großer Nachteil aller phänotypischer Subtypisierungen ist, daß sie von der Expression eines charakteristischen Phänotyps abhängig sind, welche durch Kulturbedingungen (Alter, Mediumzusätze, Temperatur, pH), Antibiotikadruck oder Entnahmeort beeinflusst werden kann. Viele Stämme sind wegen mangelnder Expression eines Phänotypes nicht typisierbar. Hinzu kommt, daß Pflege und Qualitätskontrolle von Seren und Phagensammlungen sehr aufwendig sind. Darüber hinaus bestehen aufgrund fehlender einheitlicher Serotypisierungsschemata für *Campylobacter* spp. Schwierigkeiten in der Kompatibilität (Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Laboratorien).

2.7.3.3 Genotypische Nachweismethoden

Eine genauere Typisierung erfolgt mit Methoden, welche eine Differenzierung auf Basis genetischer Unterschiede ermöglichen. Dabei werden stabile chromosomale Unterschiede nachgewiesen, welche reproduzierbar und stark diskriminierend sind. Genotypen sind im allgemeinen stabil und unabhängig von Kulturbedingungen oder Expressionen von Antigenen. Daher eignen sich diese Verfahren sehr gut für die Typisierung von Erregern unterhalb der Speziesebene wie z.B. bei epidemiologischen Fragestellungen im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen.

Vergleiche mit Serotypisierungsmethoden haben ergeben, daß die genotypischen Verfahren ihnen in ihrer Aussagekraft überlegen sind (RAUTELIN und HÄNNINEN, 1999; NIELSEN et al., 2000; WASSENAAR und NEWELL, 2000; HÄNNINEN et al., 2001). Genetische Methoden haben eine höhere Typisierbarkeit als phänotypische Methoden. Ihr Differenzierungspotential ist besser, was sich in einer größeren Anzahl verschiedener Subtypen widerspiegelt. Auch kann im Gegensatz zu phänotypischen Methoden mittels genotypischer Verfahren die relative genetische Verwandtschaft zwischen den Subtypen und damit der Grad der Gleichheit (Klonalität) bestimmt werden. Durch computergestützte Auswertungen wird eine hohe Kompatibilität ermöglicht. Die

Anwendungen sind allerdings sehr komplex und erfordern speziellere Laborausstattungen.

Für die Genotypisierung von *Campylobacter* spp. können eine Reihe von unterschiedlichen Methoden angewendet werden. Hierzu zählen die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Flagellin Typing (*fla* typing) und Ribotyping (Tab. 4).

Ein Methodenvergleich hat eine hohe Zuverlässigkeit und ein größeres Differenzierungspotential bei PFGE und Flagellin Typing ergeben als bei RAPD und Ribotyping (WASSENAAR und NEWELL, 2000). Die Diskriminierungsfähigkeit der PFGE war in Untersuchungen von GIBSON et al. (1995) doppelt so groß wie beim Ribotyping. Für den Einsatz bei epidemiologischen Fragestellungen hat sich die PFGE bereits bewährt (SUZUKI et al., 1994; GIBSON et al., 1995). Wie auch andere Genotypisierungsmethoden ist sie sehr gut einsetzbar für die Ermittlung von Infektionsherden und Übertragungswegen von *Campylobacter* spp. bei Tier und Mensch, besonders in Kurzzeituntersuchungen (MATSUDA et al., 1995; MANNING et al., 2001).

Tab. 4: Charakteristika genotypischer Typisierungsmethoden (modifiziert nach WASSENAAR und NEWELL, 2000)

Methode	Typisierbarkeit *	Reproduzierbarkeit	Diskriminierungspotential	Sensitivität **	Dauer	Vorteile	Nachteile
PFGE	100%	gut	sehr gut	ja	3-4 d	-relativ einfache Interpretation	-aufwendige Durchführung -hohe Kosten (Geräte, Material) -hoher Zeitaufwand
AFLP	100%	gut	gut bis sehr gut	nein	2-3 d	-relativ einfache Interpretation	-aufwendige Durchführung -hohe Kosten (Geräte, Material)
RAPD	~80%	mäßig	gut bis sehr gut	ja	<1 d	-schnell -preiswert	-schwierige Interpretation -viele Variablen beeinflussen Reproduzierbarkeit
<i>fla</i> typing	100%	gut	befriedigend	ja	<1 d	-schnell -preiswert -einfache Durchführung	-schlechte Kompatibilität
Ribotyping	100%	gut	mäßig	ja	3-4 d	-relativ einfache Interpretation	-aufwendige Durchführung -hohe Kosten (Geräte, Material) -hoher Zeitaufwand

*= Anteil typisierbarer Stämme

**= gegenüber genetischer Instabilität

2.7.3.3.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Bei dieser Technik handelt es sich um eine Variation der normalen Agarose-Elektrophorese. Sie ist auch bekannt als „genomic fingerprinting“ und wurde von SCHWARTZ und CANTOR 1984 in ihrer Urform entwickelt. Seitdem wurde sie ständig weiterentwickelt und modifiziert (CARLE et al., 1986; CHU et al., 1986; CHU, 1989).

Das Verfahren basiert auf der vollständigen Isolierung der chromosomalen DNA nach der Zellauflösung. Dabei werden intakte Bakterien in Gelblöckchen („Inserts“) eingegossen und alle Verdauungsschritte in diesem durchgeführt. Die Gelsubstanz sorgt für den Schutz vor Scherkräften und bewahrt somit die DNA vor unspezifischer Restriktion. Entscheidend ist die An- oder Abwesenheit von genau definierten Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme, welche mit niedriger Häufigkeit im Genom schneiden. Die Variation im Vorhandensein relevanter Schnittstellen bestimmt das genotypische Profil (OWEN et al., 1995; STANLEY et al., 1995). Als sogenannte „selten schneidende“ („rare cutter“) Restriktionsendonukleasen werden hauptsächlich *SmaI*, *KpnI*, *SaII*, *ApaI* und *BssHII* eingesetzt (WASSENAAR und NEWELL, 2000). Diese sorgen für die Auftrennung der DNA in wenige sehr große hochmolekulare Fragmente (10-800 Kb).

Das Gel mit der geschnittenen DNA wird nacheinander durch zyklisches An- und Abschalten von angelegten Spannungen (Pulse) zwei elektrischen Feldern mit unterschiedlicher räumlicher Orientierung ausgesetzt. Alle DNA-Fragmente haben in der niederprozentigen nichtdenaturierenden Gelmatrix die gleiche Mobilität, so daß keine Auftrennung stattfindet und wandern zunächst der Länge nach ausgestreckt in Richtung des elektrischen Feldes. Nach Abschalten des elektrischen Feldes, nehmen die Moleküle wieder gestauchte Strukturen ein („Faltung“) und wandern nicht weiter. Anschließend wird im 90°, 120°- oder 180°-Winkel zur Richtung des ursprünglichen elektrischen Feldes eine elektrische Spannung angelegt, so daß ein zweites elektrisches Feld entsteht. Längere DNA-Fragmente benötigen mehr Zeit als kürzere, um sich neu auszurichten („Entfaltung“). Die Ausrichtungsdauer ist dabei proportional zu ihrer Größe. Dann wird wieder Spannung in Richtung des ersten Feldes angelegt. Durch mehrfache Wiederholung des Richtungswechsels im elektrischen Feld (Pulsfeld) entfernen sich die unterschiedlich großen Moleküle immer weiter

voneinander, wodurch eine Auftrennung gestaffelt von den kleinsten bis zu den größten DNA-Molekülen stattfindet.

Die elektrophoretische Mobilität ist abhängig von der Pulsationszeit bzw. von der Dauer des elektrischen Feldes. Durch Variation der Pulsationszeit kann die bestmögliche Auftrennung je nach Fragmentgröße erreicht werden. Die resultierenden Restriktionsprofile („macrorestriction profiles“) sind, vergleichbar mit einem Fingerabdruck, charakteristisch für die jeweils untersuchten Bakterienstämme. Das Bandenmuster ist abhängig von der Art der Restriktionsenzyme und den elektrophoretischen Bedingungen.

YAN et al. (1991) zeigten, daß die PFGE-Analyse von *SmaI*-verdauter genomischer DNA ein hilfreiches Mittel sowohl zur Subtypisierung von *C. jejuni* und *C. coli* als auch zur intraspezifischen Stammdifferenzierung ist. Vergleichsuntersuchungen durch MICHAUD et al. (2001), bei denen eine Genotypisierung von 147 *Campylobacter*-Isolaten unter Verwendung von *SmaI* und *KpnI* durchgeführt wurde, haben ergeben, daß *KpnI* stärker diskriminierend war als *SmaI*. Für die Erhöhung des Differenzierungspotentials sollte jedoch immer mindestens mit zwei Restriktionsenzymen (z.B. *SmaI*, *KpnI*) geschnitten werden (IMAI et al., 1994; MATSUDA et al., 1995; ON et al., 1998).

Die PFGE zählt zu den am meisten angewendeten Methoden und wird oft als „gold standard“ zur Genotypisierung dargestellt. GIBSON et al. (1995) fanden in Untersuchungen zusammen mit Anwendung der Phagentypisierung und Ribotypisierung bei der PFGE die größte diskriminatorische Potenz. Vergleiche von einer phänotypischen (Serotyping) und fünf genotypischen Methoden (PFGE, RAPD, Ribotyping, *fla*-RFLP, *fla*-DGGE) ergaben für die PFGE zusammen mit der RAPD die größte Diskriminierungsfähigkeit. Insgesamt wurden 80 *C. jejuni*-Isolate unterschieden, welche von Geflügel, Rindern, Menschen und Wasser stammten (NIELSEN et al., 2000). Auch in anderen Vergleichsuntersuchungen von Genotypisierungsmethoden zeigte die PFGE die größte Diskriminierungsfähigkeit (OWEN et al., 1995; STEELE et al., 1998).

Ein Nachteil sind jedoch der hohe Kosten- und Zeitaufwand. Darüber hinaus sind noch keine Standardisierungen und Harmonisierungen in der Anwendung (z.B. Restriktionsenzyme, elektrophoretische Einstellungen, Nomenklatur usw.) der PFGE bei *C. jejuni* und *C. coli* bekannt. Für die Etablierung einer standardisierten Typisierungsmethode und um Vergleiche von PFGE-Mustern von

Campylobacter spp. aus verschiedenen Laboratorien zu ermöglichen, wurde ein thematisches Netzwerk („CampyNet“) gebildet. Dieses stellte im Juli 2000 ein PFGE-Prototyp-Standardprotokoll zur Typisierung von *C. jejuni* und *C. coli* zur Verfügung (ANONYMUS, 2000a). Eine Anwendung dieser Methode in modifizierter Form bei 150 *Campylobacter*-Isolaten bestätigte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und damit die Voraussetzung für epidemiologische Aussagen. Außerdem wurde bei Erfüllung der geforderten Parameter ein internationaler Austausch der Daten in Betracht gezogen (BECKMANN et al., 2002).

Anwendung der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Anwendbarkeit für epidemiologische Untersuchungen wurde von zahlreichen Autoren beschrieben (SUZUKI et al., 1993, 1994; NEWELL et al., 2001; SHREEVE et al., 2002). So konnte die PFGE effektiv bei Vergleichsuntersuchungen von *C. jejuni*- und *C. coli*-DNA im Rahmen epidemiologischer Fragestellungen eingesetzt werden (YAN et al., 1991; HARRINGTON et al., 1999). ON et al. (1998) konnten epidemiologische Zusammenhänge bei 34 *Campylobacter*-Isolaten, welche von Geflügel, Menschen, Wasser und Rindern stammten, durch Genotypisierung mittels PFGE herstellen.

SMITH et al. (2000) erkannten durch den Vergleich von DNA-Fragmentmustern von *C. coli* einen Zusammenhang zwischen humanen und Geflügel-Stämmen. In einer 3-Jahres-Studie typisierten HÄNNINEN et al. (2000) *C. jejuni*-Isolate von Hühnern aus dem Handel und von Menschen, die an Campylobakteriose erkrankt waren. Sie fanden bei Mensch- und Geflügel-Stämmen gleiche Genotypen. Auf ähnliche Resultate kamen NADEAU et al. (2002) und DICKINS et al. (2002), nachdem sie ebenfalls humane und Geflügel-Isolate untersucht hatten. In epidemiologischen Untersuchungen von MANNING et al. (2001) konnten durch die Anwendung von PFGE, AFLP und *fla* typing gleiche Subtypen bei Geflügel- und Umgebungsproben festgestellt werden.

Eine finnische Studie belegte mittels PFGE regionale Zusammenhänge im Bezug auf *Campylobacter*-Erkrankungen bei Menschen (HÄNNINEN et al., 1998). PETERSEN und WEDDERKOPP (2001) wiesen persistierende Klone von *C. jejuni*-Stämmen in Geflügelherden anhand ihrer Makrorestriktionsprofile nach.

2.7.3.3.2 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die AFLP-Methode zeichnet sich neben ihrem hohen Differenzierungsvermögen auch durch ihre hohe Reproduzierbarkeit und sehr gute Typisierbarkeit aus und ist der PFGE ebenbürtig (WASSENAAR und NEWELL, 2000; CHAMPION et al., 2002). Ursprünglich für die Genotypisierung von Pflanzen entwickelt, wurde sie nach Modifizierung auch für Bakterien eingesetzt (JANSSEN et al., 1996; KIEM et al., 1997). Für die Subtypisierung von *Campylobacter* spp. in epidemiologischen Fragestellungen konnte die AFLP-Methode erfolgreich eingesetzt werden (DUIM et al. 1999; LINDSTEDT et al., 2000).

In der AFLP wird eine Kombination von PCR-Amplifikation und Restriktionsenzymerkennung verwendet. Zunächst wird die gesamte chromosomale DNA isoliert und mit zwei „relativ häufig schneidenden“ Restriktionsendonukleasen (z.B. *HhaI* und *HindIII*; *BglII* und *Csp6I* oder *EcoRI* und *MseI*) an enzymtypischen Sequenzen restringiert. Nach der Ligation von doppelsträngigen, enzyspezifischen Oligonukleotid-Adaptoren an die Enden der entstehenden Restriktionsfragmente wird ein Teil dieser DNA-Fragmente mittels PCR selektiv amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen dienen dabei als primerspezifische Sequenzen mit Zusatz von einem oder mehreren spezifischen Nukleotiden.

Im Gegensatz zur PFGE entstehen viel mehr Fragmente, welche wesentlich kleiner sind (35-570 bp). Diese können auf Acrylamidgelen mit hoher Auflösung analysiert werden. Für die Typisierung wird nur sehr wenig DNA benötigt. Die Durchführung ist relativ schnell, dafür aber aufwendig und teuer (Geräte, Material). Abhängig von der gewählten Enzymkombination erhält man ca. 35-100 Banden, wodurch die Interpretation erschwert wird. Eine Standardisierung der Methode für die Verbesserung der Kompatibilität ist daher notwendig.

2.7.3.3.3 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Diese Methode basiert auf der PCR, ohne jedoch spezifische loci zu amplifizieren. Sie wurde zuerst von WILLIAMS et al. (1990) sowie von WELSH und MCCLELLAND (1990) als einfache Technik zur Differenzierung zwischen verschiedenen Organismen beschrieben.

Durch den Einsatz sogenannter Zufallsprimer werden entsprechend der jeweiligen Basensequenz (ca. 9-10 Basen) nur einige Stücke der Bakterien-

DNA amplifiziert. Die Sequenzen der kurzen Primer (Oligonukleotide) sind dabei nicht spezifisch gegen ein bekanntes Target-Gen gerichtet, so daß diese „zufällig“ an verschiedene Bereiche im Genom hybridisieren können. Sind zwei dieser Bereiche nahe genug benachbart, kann die dazwischen liegende Sequenz amplifiziert werden. Da die Amplifikationsbedingungen von niedriger Stringenz sind, können auch Fragmente amplifiziert werden, wenn die Primer nicht perfekt passen. Die Auftrennung der resultierenden PCR-Produkte erfolgt durch eine Agarose-Gelelektrophorese, wobei die erhaltenen Muster von der Anwesenheit, Orientierung und Lokalisation der Primerbindungsstellen abhängen. Deswegen treten die Banden mit stark unterschiedlicher Intensität auf, was die Interpretation erschwert (WASSENAAR und NEWELL, 2000).

Aufgrund der benötigten niedrigen Stringenz für die PCR ist die Methode sehr sensitiv gegenüber den experimentellen Bedingungen (Reinheit und Konzentration der DNA, Inhibitoren, PCR-Gerät, usw.). Daraus resultiert eine schlechte Reproduzierbarkeit und damit eine eingeschränkte Kompatibilität. Vorteil der Methode gegenüber PFGE und AFLP ist ihr geringer Zeit- und Kostenaufwand sowie die Einfachheit der Durchführung. Für *Campylobacter* spp. gibt es eine Reihe von RAPD-Methodenbeschreibungen unter Verwendung unterschiedlicher Primer und Reaktionszeiten (MAZURIER et al., 1992; LAM et al., 1995; FUJIMOTO et al., 1997).

2.7.3.3.4 Flagellin Typing (*fla* typing)

Auf dem Genom von *C. jejuni* und *C. coli* befinden sich zwei Flagellin-Gene (*flaA* und *flaB*), welche eng nebeneinander lokalisiert sind und deren Transkriptionsprodukte für den Aufbau der Geißel (Flagellin-Untereinheiten A und B) verwendet werden (NUIJTEN et al., 1990). Diese hoch konservierte Genomregion mit variablen Bereichen wird für eine RFLP-Analyse („restriction fragment length polymorphism“) von PCR-Produkten, die aus Flagellin-Genen stammen, genutzt (MEINERSMANN et al., 1997).

Dabei werden *fla* spezifische PCR Primer verwendet, um ein PCR Fragment zu erhalten, welches mit Restriktionsenzymen gespalten wird. Abhängig vom Primer kann die PCR entweder ein oder zwei *fla* Gene erkennen. Das *fla* Typisierungsschema ist dabei abhängig von der Art der eingesetzten Primer und

Restriktionsenzyme. Durch die Anwendung von mehreren Restriktionsenzymen kann das Differenzierungspotential erhöht werden.

Insgesamt wurden bisher sieben *fla* typing-Methoden für *Campylobacter* spp. entwickelt (WASSENAAR und NEWELL, 2000). Durch diese vielen Variationen in der Anwendung besteht eine niedrige Kompatibilität der Ergebnisse. Trotz hoher Typisierbarkeit ist die Diskriminierungsfähigkeit aufgrund genetischer Instabilitäten durch intergenomische Rekombinationen zwischen *flaA*-Genen unterschiedlicher *Campylobacter*-Stämme (HARRINGTON et al. 1997) sowie intragenomische Rekombinationen zwischen *flaA*- und *flaB*- Genen individueller Stämme eingeschränkt.

2.7.3.3.5 Ribotyping

Grundlage dieser Methode ist die An- oder Abwesenheit von Restriktionsschnittstellen in bzw. in der Nähe der drei ribosomalen Loci bei *Campylobacter* spp. (codierend für 5S, 16S und 23S rRNA), welche über Southern blot Hybridisierung sichtbar gemacht werden.

Zunächst wird die restringierte DNA nach Auftrennung in der Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Southern blot) und mit einer spezifischen DNA-Sonde, die chemilumineszent oder enzymmarkiert ist, hybridisiert. Bei der Sonde handelt es sich um ein Oligonukleotid, das spezifisch für ribosomale RNA Gene ist. Sie bindet nur an komplementäre DNA-Bereiche und visualisiert auf diese Weise einzelne DNA-Fragmente, nachdem durch enzymatische Reaktionen ein Farbstoff freigesetzt wird. Das Bandenmuster ist abhängig von der Wahl der Restriktionsenzyme sowie der Wahl des markierten DNA-Fragments, welches aus den für die 16S rRNA und 23S rRNA kodierenden Genen erzeugt werden kann.

Problem dieser Methode ist der große Arbeitsaufwand bei relativ niedrigem Differenzierungspotential, da die meisten *Campylobacter* spp. nur drei ribosomale Loci besitzen.

2.7.3.4 Genetische Instabilität

Wichtig für Verfolgsuntersuchungen ist die genetische Stabilität der zu genotypisierenden Isolate. Da bei der PFGE die gesamte genomische DNA durch Restriktionsenzyme verdaut wird und die daraus resultierenden Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt werden, können auch bestimmte Veränderungen im Genom zu einer Veränderung des Bandenmusters führen. In der Regel ändern sich Genotypen nicht, wenn die Isolate bei Tiefkühltemperaturen gelagert, kultiviert oder in vivo passagiert werden.

MANNING et al. (2001) konnten die genetische Stabilität eines *C. jejuni*-Stammes trotz mehrfacher Subkultivierung über einen Zeitraum von 18 Jahren nachweisen. BECKMANN et al. (2002) konnten bei 150 *Campylobacter*-Stämmen, welche über Jahre bei -80°C auf Mikrobank (Mast Diagnostics) bzw. auf Glasperlen in Brucella-Bouillon mit Glycerin (10% v/v) konserviert waren, keine genomischen Veränderungen feststellen. ON (1998) berichtete dagegen von dem Auftreten genetischer Instabilität bei *Campylobacter*-Isolaten nach längerer Lagerung und häufigem Subkultivieren. Ähnliches berichteten DICKINS et al. (2002). Nach 50 Passagen von 4 Stämmen änderte sich bei einem Isolat das DNA-Fragmentmuster.

Außerdem wurde über Änderungen von PFGE-Genotypen innerhalb einer klonalen Linie berichtet, welche auf intra- und intergenomischen Rekombinationen, Insertionen, Deletionen sowie Punktmutationen beruhten (WASSENAAR et al., 2000). Der Erwerb von Genen kann über horizontalen Transfer in oder zwischen Bakterienpopulationen erfolgen. Bei *C. jejuni*-Stämmen finden vermutlich häufig genetische Veränderungen über Rekombinationen in bzw. zwischen den Spezies statt (SUERBAUM et al., 2001). WASSENAAR et al. (1998) fanden nach oraler Infektion bei 21 Hühnerisolaten 14 verschiedene Genotypen von *C. jejuni*, bei denen sie aufgrund der kaum voneinander abweichenden Bandenmuster von einem gemeinsamen klonalen Ursprung ausgingen. Als Ursache für die Unterschiede wurden genomische Veränderungen vermutet. Die Häufigkeit dieser Erscheinungen kann von Stamm zu Stamm unterschiedlich sein. DE BOER et al. (2002) wiesen bei Versuchen, in denen sie Hühner mit markierten *C. jejuni* – Stämmen (Antibiotikaresistenzmarker) infizierten, genetische Rekombinationen mittels PFGE nach.

Ursachen und Auslöser für diese genomischen Neuordnungen sind noch nicht geklärt. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß z.B. im Genom von *C. jejuni* nicht genügend regulierende Gene vorhanden sind (PARKHILL et al., 2000). Für Kurzzeitstudien, wie z. B. horizontale Verbreitung von *Campylobacter* spp. in der Schlachtung müssen diese Erscheinungen jedoch nicht unbedingt relevant sein. Bei Langzeitstudien empfiehlt sich jedoch die Anwendung von zwei unabhängigen Techniken (phänotypisch oder genotypisch) mit entsprechend ausreichendem Differenzierungspotential oder die Anwendung zweier Restriktionsenzyme (z.B. in der PFGE), um mögliche Effekte der genetischen Instabilität zu korrigieren.

2.8 Epidemiologie

2.8.1 *Campylobacter* spp. in Mastgeflügelherden

Zahlreiche Studien haben die zentrale ätiologische Rolle von kontaminiertem Geflügelfleisch bei der Campylobakteriose des Menschen beschrieben (HARRIS et al., 1986; ATABAY und CORRY, 1997; ALTEKRUSE et al., 1998; FRIEDMAN et al., 2000; NADEAU et al., 2002). Im Gegensatz zu anderen Nutztieren (Schwein, Rind) sind die Isolierungsraten von *Campylobacter* spp. beim Mastgeflügel häufig sehr hoch. Eine Übersicht über das Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Mastgeflügelherden geben die Tabellen 5 und 6. Besonders gefährdet sind Bestände in ökologischer Freilandhaltung (HEUER et al., 2001). Es ist aber auch *Campylobacter*-freie Geflügelmast möglich (SMITHERMAN et al., 1984; HUMPHREY et al., 1993).

Die Keimbelastungen der Herden sind saisonalen Schwankungen unterworfen mit höchsten Prävalenzen im Sommer und Herbst (KAPPERUD et al., 1993; JACOBS-REITSMA et al. 1994b; REFRÉGIER-PETTON et al., 2001; WEDDERKOPP et al., 2001). Die Ursachen hierfür sind noch nicht geklärt. Wahrscheinlich sind Temperatur und UV-abhängige Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt ein bedeutender Faktor (KIST, 2002).

Der Gastrointestinaltrakt von warmblütigen Tieren ist ein natürliches Habitat für *Campylobacter* spp. Speziell Mastgeflügel und Wildvögel gelten als Reservoir, ohne daß die Tiere klinisch erkranken (GLÜNDER et al., 1988; ANNAN-PRAH

und JANC, 1988). Hepatoenterale Erkrankungen wie z.B. Nekrosen in der Leber treten aufgrund verbesserter Haltungs- und Hygienebedingungen nur noch vereinzelt auf (GLÜNDER und WIELICZKO, 1990; GLÜNDER, 1993). Besonders hoch ist die Kolonisation im Blinddarm, Dickdarm und in der Kloake mit *Campylobacter*-Keimzahlen von 10^5 bis 10^9 /g Darminhalt (BEERY et al., 1988; BERNDTSON et al., 1992; ACHEN et al., 1998). Die Keime halten sich dort bevorzugt als Kommensalen in den Krypten des Darmepithels auf (BEERY et al., 1988). Dort haften sie sich an die Oberflächenzellen, wofür das OMP CadF zuständig zu sein scheint, welches die Bindung von *Campylobacter* spp. an Fibronectin ermöglicht. Versuche mit Mutanten haben ergeben, daß eine Bindung ohne dieses OMP nicht möglich ist (ZIPRIN et al., 1999). Die im Vogeldarm vorherrschende Temperatur von +42°C sowie die entsprechende Atmosphäre sind optimale Wachstumsbedingungen für den Keim und sprechen für eine hohe Adaptation.

In Inokulationsversuchen lag die minimale Infektionsdosis bei Eintagsküken abhängig vom Stamm und der Widerstandskraft der Tiere zwischen 100 und 1000 KbE (BOLDER und MULDER, 1991). Dabei können sich die *Campylobacter*-Stämme in bezug auf ihre Pathogenität für Mensch und Tier unterscheiden. Vorrangig findet die Kolonisation durch *C. jejuni* statt (90-100%), gefolgt von *C. coli* (5-10%) (PETERSEN et al., 2001; NADEAU et al., 2002). Erst im Alter von 2-3 Wochen erfolgt in der Regel die Infektion (JACOBS-REITSMA et al., 1995b; BERNDTSON et al., 1996b). Dabei spielen möglicherweise der Verlust maternaler Antikörper nach 2 Wochen (MYSZEWSKI und STERN, 1990; CAWTHRAW et al., 1994), eine inhibitorische Blinddarmflora (HUMPHREY et al., 1993) sowie ein verringertes Kolonisationspotential gestreßter Organismen aus der Umgebung (CAWTHRAW et al., 1996) für die relativ späte Infektion eine Rolle. KAINO et al. (1988) zeigten, daß 5 Wochen alte Hühner für *Campylobacter* spp. empfänglicher sind als Küken im Alter von 3 Tagen.

Tab. 5: Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Mastgeflügelherden in Ländern der Europäischen Union mit Monitoring-Programmen (modifiziert nach EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2003)

Land	1999		2000		2001	
	Proben- anzahl	davon positiv (%)	Proben- anzahl	davon positiv (%)	Proben- anzahl	davon positiv (%)
Dänemark	6557	46,0	6160	37,7	6054	41,9
Finnland	1132	4,0	1094	5,8	1069	4,0
Schweden	3846	9,2	3969	9,9	4220	16,2 *
Niederlande	151	16,6	128	24,2	123	16,3
Nordirland	194	21,6	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

*= Änderung der Probenentnahme während des Jahres 2001

k.A.= keine Angabe

Tab. 6: Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Geflügelmastbeständen

Land	Probenart	Anzahl	positiv (%)	Autor
Dänemark	Kloakentupfer	8911 H	3790 (43)	Wedderkopp et al., 2001
	Kot	1250 ET	509 (41)	Dang et al., 2001
Deutschland	Kloakentupfer	24 H	13 (54)	Altmeyer et al., 1985
	Kot	607 ET	36 (6)	Hartung, 2001
England	Blinddarmkot	49 H	37(76)	Humphrey et al., 1993
	Kloakentupfer	12.233 ET	3.304 (27)	Pearson et al., 1996
Finnland	Blinddarmkot	490 ET	117 (24)	Aho und Hirn, 1988
Frankreich	Sammelkot	184 H	131 (71)	Denis et al., 2001
Irland	Kot	400 ET	348 (87)	Fallon et al., 2001
Kanada	Kot	60 H	28 (47)	Prescott und Gellner, 1984
Niederlande	Kotupfer	187 H	153 (82)	Jacobs-Reitsma et al., 1994b
	Sammelkot	112 H	64(57)	van de Giessen et al., 1996
Norwegen	Kot	176 H	32 (18)	Kapperud et al., 1993
Schweden	Blinddarmkot	287 H	77 (27)	Berndtson et al., 1996b
USA	Blinddarmkot	32 H	28 (88)	Stern et al., 2001

H= Herde

ET= Einzeltier

Die Epidemiologie der *Campylobacter*-Verbreitung ist noch nicht vollständig erforscht. Eine vertikale Übertragung der Erreger, d.h. über die Ovarien und Eier scheint für die Epizootiologie keine Rolle zu spielen (SHANE et al., 1986; SHANKER et al., 1986). Eine horizontale Übertragung über die Brütereiern ist ebenfalls unwahrscheinlich, da bei Küken unter Feldbedingungen keine *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden konnten (HUMPHREY et al., 1993; JACOBS-REITSMA et al., 1995b; BERNDTSON et al., 1996b). Dagegen ist eine horizontale Übertragung aus der bzw. in die Umgebung wahrscheinlicher (KAZWALA et al., 1990; VAN DE GIESSEN et al., 1996).

In vielen Untersuchungen wurde von einer horizontalen Verbreitung über Einstreu (MIFLIN et al., 1999), nicht gechlortes Tränkwasser (KAPPERUD et al., 1993; PEARSON et al., 1993), Käfer, Mehlwürmer (JACOBS-REITSMA et al., 1995b), Fliegen (BERNDTSON et al., 1996b), Ratten (KAPPERUD et al., 1993) und Mäuse (BERNDTSON et al., 1991a,b) ausgegangen. Besonders Wildvögel stellen ein potentiell Infektionsrisiko v.a. bei Freilandhaltung dar. Bei Umgebungsproben von Geflügelställen (Fliegen, andere Insekten, Wildvögel, Mäuse, Haustiere, Bodentupfer) konnten eng verwandte und z.T. gleiche Genotypen von *Campylobacter* spp. wie in den Herden typisiert (*fla* typing) werden (HIETT et al., 2002). Auch über das Personal kann ein Eintrag durch kontaminierte Schuhe, Kleidung und Arbeitsgeräte erfolgen (LINDBLOM et al., 1986). Sogar in der Luft wurden *Campylobacter* spp. nachgewiesen, was eine mögliche Gefahr für eine Erregereinschleppung zwischen eng benachbarten Ställen z.B. über Ventilationsöffnungen während des Reinigungsvorganges darstellt (BERNDTSON et al., 1996b). Kreuzkontaminationen durch andere Haus- und Wildtiere (Schweine, Rinder, Schafe, Ziegen), die mit Geflügel auf demselben Gelände landwirtschaftlich gehalten wurden, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (VAN DE GIESSEN et al., 1996, 1998).

Geflügelfutter ist als Kontaminationsquelle für *Campylobacter* spp. unbedeutend. Ursache ist möglicherweise die Pelletierung (Pasteurisationstemperaturen) sowie die geringe Wasseraktivität (a_w -Wert <0,8) des Futters (HUMPHREY et al., 1993; JACOBS-REITSMA et al., 1995b). Untersuchungen sowohl in einer Futtermühle als auch in der Mast fielen negativ aus (GENIGEORGIS et al., 1986; JONES et al., 1991a). In der Abbildung 3 sind

mögliche Übertragungswege von *Campylobacter* spp. in Geflügelfarmen zusammengefaßt.

Hauptrisikofaktoren sind unzureichende Tränkendesinfektionen und nicht sachgemäße Benutzung der Desinfektionsmatten zur Stiefeldesinfektion (EVANS und SAYERS, 2000). Sobald eine Herde infiziert ist, erfolgt eine rapide Ausbreitung der Keime (SHANKER et al., 1990), so daß die Infektionsrate gegen Ende der Aufzucht bis zur Schlachtung häufig bei 100% liegt (JACOBS-REITSMA et al., 1994b, 1995b; BERNDTSON et al., 1996b; GREGORY et al., 1997; EVANS und SAYERS, 2000). Dabei spielt v.a. die hohe Dichte der Tiere in der Stallhaltung eine Rolle.

Durch fäkale Verunreinigungen können die Keime auch in das Gefieder und auf die Haut gelangen, überleben dort aber nur dann länger, wenn das Gefieder feucht ist. Auch die Koprophagie beim Geflügel ist ein möglicher Faktor, der zur raschen Verbreitung auf fäkal-oralem Wege beitragen kann. Streßfaktoren wie Futterentzug vor der Schlachtung, Einfangen und Transport sowie Keimeintrag durch unzureichend gereinigte und desinfizierte Transportkisten erhöhen die Infektionsrate (STERN et al., 1995; CORRY und ATABAY, 2001; WHYTE et al., 2001b; SLADER et al., 2002).

Eine Reinfektion neu eingestellter Herden ist nach gründlicher Reinigung, Desinfektion und Trocknung unwahrscheinlich (VAN DE GIESSEN et al., 1992; BERNDTSON et al., 1996a; GREGORY et al., 1997). Allerdings muß ein Persistieren der Keime in Stallnischen bei schlechter Reinigung und Desinfektion in Erwägung gezogen werden (VAN DE GIESSEN et al., 1992). In einer Studie, bei der 75 Geflügelherden von 9 verschiedenen Farmen in mehreren Mastperioden u. a. mittels PFGE auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. untersucht wurden, konnten bei 63% der Herden persistierende Klone isoliert werden. Die Herkunft wurde im Stall oder der näheren Umgebung vermutet (PETERSEN und WEDDERKOPP, 2001). Auch HIETT et al. (2002) konnten das Persistieren bestimmter Klone nach Typisierung von Isolaten aus 16 Herden mittels *fla* typing bestätigen.

Obwohl eine große Stammvielfalt bei unterschiedlichen Farmen und Herden vorherrscht, sind die Tiere einer Herde häufig mit einem dominanten Genotyp mit höherem Kolonisationspotential infiziert (MATSUDA et al., 1995; NEWELL et al., 2001). NADEAU et al. (2002) konnten in einer kanadischen Studie trotz

starker genetischer Stammvielfalt einen dominanten Genotyp finden, den sie unter Verwendung der PFGE in 43 von 56 positiven Herden in mehreren Mastperioden (76,8%) wiederfanden. PETERSEN et al. (2001) haben dagegen in dänischen Untersuchungen von 8 Geflügelherden mit guten Hygienebarrieren mittels verschiedener Genotypisierungsmethoden ein bis drei unterschiedliche *Campylobacter*-Klone gefunden, die nebeneinander koexistierten, ohne daß eine Dominanz zu erkennen war. Auch THOMAS et al. (1997) ermittelten 5 unterschiedliche Genotypen, die innerhalb einer Herde koexistierten. Als Ursache für die Vielfalt vermuteten sie Umwelteinflüsse und genetische Instabilität.

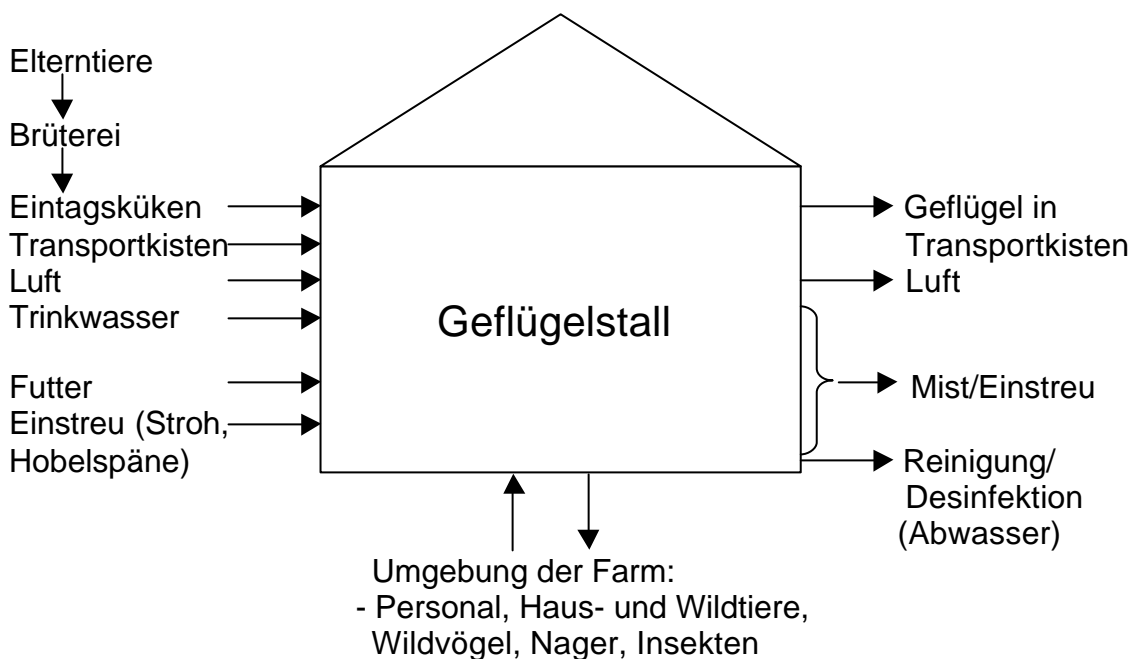


Abb. 3: Mögliche Übertragungswege von *Campylobacter* spp. in einer Geflügelfarm (modifiziert nach JACOBS-REITSMA, 1994b)

2.8.2 *Campylobacter* spp. in der Geflügelschlachtung

Schlachtvorgang und Verarbeitung der Schlachtkörper von *Campylobacter*-belasteten Herden können zu einem Eintrag von relativ hohen Keimzahlen in die Schlachtkette führen. Die Erreger befinden sich vor allem im Gastrointestinaltrakt sowie durch Schmierinfektionen auf Haut und Federn (GENIGEORGIS et al., 1986; IZAT et al., 1988; BERNDTSON et al., 1992;

MEAD et al., 1995). *Campylobacter*-negative Herden sind sowohl durch verunreinigte Transportkisten als auch durch im Schlachthaus persistierende Stämme gefährdet (GENIGEORGIS et al., 1986).

Bereits vor Schlachtung können Transportkäfige und Fahrzeuge kontaminiert sein, was zu Kreuzkontaminationen während des Transportes führen kann (BERNDTSON et al., 1996b; VAN DE GIESSEN et al., 1998). In Untersuchungen von STERN et al. (1995) wurde nach dem Transport eine stärkere Oberflächenkontamination der Tiere mit *Campylobacter* spp. festgestellt als vorher. NEWELL et al. (2001) gelang der Nachweis von Kontaminationen negativer Schlachtchargen durch belastete Transportkisten. Auch JACOBS-REITSMA und BOLDER (1998) stellten fest, daß eine Infektion unbelasteter Tiere durch kontaminierte Kisten erfolgt und gereinigte Transportkisten z.T. häufiger mit *Campylobacter* spp. belastet sind als ungereinigte. SLADER et al. (2002) bestätigten die mangelhafte Transportkistenreinigung und -desinfektion, indem sie *Campylobacter* spp. sowohl von Kisten direkt nach Reinigung und Desinfektion als auch aus dem Transportkistenwaschwasser (mit einer Temperatur von +30°C) isolierten.

Während der Schlachtung von *Campylobacter*-positiven Herden werden an den einzelnen Stationen vor allem Ausrüstung, Arbeitsflächen, Prozeßwasser und Luft mit den Erregern belastet (GENIGEORGIS et al., 1986; AHO und HIRN, 1988; MEAD et al., 1995). BERNDTSON et al. (1996b) konnten bei positiven Herden epidemiologische Zusammenhänge zwischen Isolaten aus der Mast und Isolaten von einzelnen Schlachtstationen herstellen. Alle Stämme wurden dem gleichen Serotyp zugeordnet. Auch NEWELL et al. (2001) fanden herdenspezifische Stämme (*fla* typing) in der Schlachtkette wieder. Dabei zeigten sich einige Subtypen stabiler als andere, indem sie alle Schlachtstationen überlebten. Kritische Punkte für Kreuzkontaminationen sind vor allem Rupfen, Eviszation und Tauchkühlung (OOSTEROM et al., 1983a; WEMPE et al., 1983; AHO und HIRN, 1988; IZAT et al., 1988). Kontaminiert wird vorwiegend die Haut, an die sich die Keime in einem schwer löslichem „Biofilm“ binden.

Beim Rupfen erfolgt die Keimübertragung vermutlich hauptsächlich über die Gummirupffinger, welche zusätzlich die Erreger in die Haut einmassieren. In Versuchen konnten BERRANG et al. (2000, 2001) einen deutlichen Anstieg von Hautkontaminationen mit *Campylobacter* spp. bei Schlachtkörpern nach dem

Rupfen feststellen. Sie stellten kausale Zusammenhänge zu belasteten Schlachtkörpern her, deren Faeces bei Austritt aus der Kloake Schmierinfektionen während des Rupfvorganges verursachte. Auch IZAT et al. (1988) konnten eine Keimzahlerhöhung von $1 \log_{10}$ KbE nach dem Brühen auf $2 \log_{10}$ KbE pro 1000 cm^2 Tierkörperoberfläche nach dem Rupfen nachweisen. Proben vom Abwasser des Rupfers fielen zu 94% *Campylobacter*-positiv mit einer durchschnittlichen Keimbelastungen von $3,4 \log_{10}/\text{ml}$ aus (GENIGEORGIS et al., 1986).

Bei der Eviszeration erfolgt die Kontamination durch Kropfinhalt und Eröffnung des Intestinaltraktes. RIVOAL et al. (1999) konnten bei einer Herde mittels *fla* typing Genotypen von *Campylobacter*-Isolaten, die zuvor in der Mast entnommen worden waren, direkt nach der Eviszeration auf der Halshaut wiederfinden. Sie vermuteten eine mögliche Kreuzkontamination durch Rupturen des Gastrointestinaltraktes während der Eviszeration, da sie die Genotypen bei einer in der Schlachtung folgenden Herde ebenfalls vorfanden. BERNDTSON et al. (1992) führten ebenfalls die Keimbelastung von Halshaut, Federfollikeln und Pleuroperitoneum ihrer untersuchten Herden in der Schlachtung auf das Vorkommen von *Campylobacter* spp. im Intestinaltrakt zurück. Sie vermuteten, daß die Federfollikel den Keimen einen Schutz vor möglichen Barrieren der Schlachtung (z.B. Kühlung) bieten. NEWELL et al. (2001) konnten durch Stammtypisierung (*fla* typing) ursprünglich fäkale *Campylobacter*-Isolate auf dem Endprodukt nachweisen.

Einige Typen überlebten die Keimreduktionen im Schlachtprozeß besser als andere, was zu einer potentiellen Infektion nachfolgender Schlachtchargen führen kann. Diese Kreuzkontaminationen stellen ein hygienisches Problem bei der Schlachtung *Campylobacter*-freier Herden dar. MIWA et al. (2003) konnten mittels Genotypisierung (RAPD) den Nachweis einer Kreuzkontamination mit *C. jejuni* von negativen Herden erbringen, welche direkt im Anschluß an eine positive Herde geschlachtet worden waren. Proben von Prozeßwässern (Brühwasser) und Schlachtstationen (Gummifinger der Rupfmaschine, Eviszerationsmaschine), welche vor Beginn der Schlachtung entnommen wurden, waren frei von *Campylobacter*-Kontaminationen. NEWELL et al. (2001) ermittelten einen Keimübergang von robusten *Campylobacter-fla*-Typen auf nachfolgende Herden innerhalb eines Schlachtvorganges. Die Ergebnisse

wurden in der PFGE bestätigt. Aus der Luft wurden thermophile *Campylobacter* spp. in besonders großer Anzahl beim Rupfen und in Bereichen der Eviszeration isoliert (WHYTE et al., 2001a), was auf mögliche Kreuzkontaminationen durch Aerosole schließen läßt. Während des Durchlaufes der belasteten Schlachtstationen kann die Anzahl der *Campylobacter*-positiven Karkassen sogar zunehmen (JONES et al., 1991a).

Kritische Hygienepunkte im Schlachtablauf mit wirksamer Keimreduktion sind Brühen und Kühlung. Beim Brühen unterscheidet man zwischen zwei Verfahren. Das Hochbrühen findet bei Temperaturen von +55°C bis +60°C mit einer Dauer von 60-90 Sekunden statt. Dabei kommt es zur Zerstörung und Verlust der oberen Epidermisschichten nach dem Rupfen. Darüber hinaus können Hautverfärbungen auftreten, die einen bedeutenden wirtschaftlichen Aspekt darstellen. Das Verfahren wird deshalb hauptsächlich für Gefrierware angewendet. Im Niedrigbrühverfahren wird dagegen mit einer Temperatur von +50°C bis +54°C für 120-300 Sekunden gebrüht (FRIES et al., 2001). Durch dieses schonendere Verfahren bleiben die oberen Epidermisschichten nach dem Rupfprozeß erhalten und Hautverfärbungen werden vermieden. Dieses Verfahren erfolgt bei der Produktion von Frischgeflügelwaren.

Das Brühwasser ist häufig stark verschmutzt, da es beim Eintritt in den Brühtank aufgrund der plötzlichen Temperaturveränderungen zu Muskelkontraktionen der Schlachtkörper kommt, aus deren Folge Entleerungen der Kloake auftreten können. Ein Austausch des Prozeßwassers erfolgt nur einmal täglich. Durch Eintritt von Harnsäure und Harnstoff kann das Wasser auf pH-Werte um 6,0 gepuffert werden, wodurch sich die Überlebenschance von *Campylobacter* spp. erhöht (HUMPHREY und LANNING, 1987).

Eine weitere Problematik beim Brühverfahren liegt darin, daß aufgrund der Brühtemperaturen ein Großteil der auf der Haut sitzenden Keime abgetötet wird, jedoch im Unterhautbindegewebe nur eine Temperatur von ungefähr +42°C erreicht wird, wodurch ein Überleben von thermophilen *Campylobacter* spp. ermöglicht wird. GENIGEORGIS et al. (1986) konnten keinen signifikanten Einfluß von Brühtemperaturen (+53°C und +60°C) auf die Kontamination von Brühwasser und Endprodukten mit *C. jejuni* feststellen, während Untersuchungen von IZAT et al. (1988) beim Geflügel eine Abnahme der Oberflächenkontamination auf der Haut nach dem Brühen (keine Temperatur-

angabe) zeigten. Abhängig von der Brühdauer können Temperaturen um +58°C zu stärkeren Keimreduzierungen führen als niedrigere Temperaturen um +52°C (OOSTEROM et al., 1983a). Im Brühwasser wurde bei einer Brühdauer von 90 Sekunden erst nach Absenken der Brühtemperaturen auf +53°C bzw. +49°C eine Erhöhung der Isolierungsrate festgestellt, während Proben bei +60°C negativ ausfielen. Die Brühtemperaturen hatten jedoch keinen Einfluß auf die Kontamination der Endprodukte (WEMPE et al., 1983). In Inokulationsversuchen von YANG et al. (2001) reduzierten Temperaturen von +50°C und +60°C *C. jejuni* im Brühwasser um 1,5 log₁₀ bzw. 6,2 log₁₀ KbE/ml und auf der Geflügelhaut um <1 bzw. >2 log₁₀ KbE/cm². Besonders empfindlich reagierten die Keime auf einen Temperaturwechsel von +50°C auf +55°C. Das Alter des Brühwassers (0 und 10 Stunden) spielte keine signifikante Rolle im Bezug auf die bakterielle Hitzeempfindlichkeit. WEMPE et al. (1983) demonstrierten eine geringere Belastung des Brühwassers mit *C. jejuni* als beim Abwasser aus Rumpf- und Eviszerationsbereichen. Dennoch muß der Brühtank als Quelle möglicher Kreuzkontaminationen in Betracht gezogen werden (BAKER et al., 1987).

Die Kühlung erfolgt als Tauch-, Luft- oder Luft-Sprühkühlung. Ziel ist die Absenkung der Körpertemperatur von ca. +41°C auf eine Innentemperatur von maximal +4°C (FRIES et al., 2001). In der „Tauchkühlung im Gegenstrom“ werden die Schlachtkörper durch zwei hintereinandergeschaltete Wassertanks (Vor- und Hauptkühler) mit Schneckenantrieb geführt. Durch den „Spüleffekt“, kann dieses Verfahren neben dem Waschen eine Keimreduzierung auf der Haut des Schlachtkörpers bewirken (OOSTEROM et al., 1983a; BAKER et al., 1987; IZAT et al., 1988). BERNDTSON et al. (1996b) konnten jedoch keinen reduzierenden Effekt auf die Keimbelastung durch die „Tauchkühlung im Gegenstrom“ feststellen. Die Halshaut der untersuchten Geflügelkarkassen blieben nach der Kühlung auch mit Zusatz von Chlor zu 95 % mit *Campylobacter* spp. kontaminiert. Untersuchungen des Kühlwassers von WEMPE et al. (1983) ergaben eine 100%ige Kontamination nach Schlachtung positiver Herden, was ein hohes Risiko der Kreuzkontamination für unbelastete Herden in sich birgt. Im Anschluß an dieses Kühlverfahren ist daher eine Frostung der Ware bei –40°C vorgeschrieben (FRIES et al., 2001).

Bei der Luftkühlung werden die Schlachtkörper am Transportband hängend durch Tunnel geführt und über kalte Luft mit Temperaturen zwischen 0°C und -8°C bei Luftgeschwindigkeiten zwischen 0,5 bis 8 m/s 60 bis 90 Minuten gekühlt. Das Risiko der Kreuzkontamination ist bei dieser Methode möglicherweise geringer, da die Tiere einzeln hängend mit geringeren Kontakt gekühlt werden (SANCHEZ et al., 2002).

Eine Kombination aus Naß- und Trockenkühlung stellt die Luft-Sprühkühlung dar. Die Schlachtkörper werden bei dieser Methode periodisch mit Wasser besprüht, während gleichzeitig eine Luftkühlung mit Temperaturen von -5°C bis +3°C bei mittlerer Luftgeschwindigkeit von 1 bis 5 m/s erfolgt. Durch die Verdunstungswärme wird eine Abkühlung auf +4°C bis +6°C in bereits 40 bis 45 Minuten erreicht (SIELAFF, 1996).

Die Kühlung kann zwar über Temperatur, hohe Sauerstoffspannung und Abtrocknung (a_w -Wert-Senkung) der Oberfläche zu einer *Campylobacter*-Reduzierung führen bzw. eine Vermehrung hemmen, jedoch ist diese Schranke ebenso wie der Brühvorgang nicht effektiv genug, um eine Keimzahl unterhalb der minimalen Infektionsdosis zu erreichen. FLUCKEY et al. (2003) konnten keine signifikante Abnahme von *Campylobacter* spp. auf Geflügelkarkassen nach der Luftkühlung feststellen. Nach Eintrag von *Campylobacter* spp. in die Schlachtkette sind Endprodukte und eßbare Nebenprodukte wie Leber, Magen und Herz häufig kontaminiert (Tab. 7, Tab. 8). *Campylobacter*-Klone vom Geflügel aus der Mast konnten auch nach der Schlachtung auf den Endprodukten mittels *fla* typing nachgewiesen werden (HIETT et al., 2002). Die Angaben über Kontaminationen variieren aufgrund unterschiedlicher Probenanzahlen (Statistik), Probenarten (z.B. 25 g Halshaut, 25 g Fleisch, 1 cm² Haut, Ganzkörperspülung usw.) und Methoden (mit/ohne Voranreicherung, Direktausstrich, Nährmedien, verschiedene Inkubationstemperaturen und -zeiten usw.). Im Durchschnitt wurden bei Hühnerkarkassen (ohne Innereien) bis zu 10⁶ KbE *Campylobacter* spp. isoliert (BRYAN und DOYLE, 1995). In einer Studie von JORGENSEN et al. (2002) waren 83% von 241 untersuchten Hähnchen aus dem Handel mit bis zu >9 log₁₀ KbE *Campylobacter* spp. kontaminiert. BOLTON et al. (1999) und KRAMER et al. (2000) kamen mit 83% bzw. 86% *Campylobacter*-Belastung bei Geflügelfleisch und -produkten zu ähnlichen Ergebnissen. Bei Muskelmägen von positiven Schlachttieren wurden

von IZAT et al. (1988) auch nach der Kühlung Keimbelastungen nachgewiesen. Herzen und Lebern waren ebenfalls sowohl bei *Campylobacter*-positiven Herden als auch bei negativen Herden in direkter Schlachtfolge kontaminiert (GENIGEORGIS et al., 1986). Untersuchungen von gefrorenen Hühnerlebern aus dem Handel ergaben eine Isolierungsrate von 93% (FERNÁNDEZ und PISÓN, 1996). BAUMGARTNER et al. (1995) konnten bei 139 frischen und 144 tiefgefrorenen Hühnerlebern aus dem Handel 31% bzw. 16% Kontaminationen mit *Campylobacter* spp. ausmachen. Sie vermuteten einen keimreduzierenden Effekt durch den Tiefkühlprozeß.

Tab. 7: Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. in Hähnchenfleisch und -produkten

Land	Probenart	Anzahl/positiv	<i>C.jejuni</i> (%)	<i>C.coli</i> (%)	<i>C.lari</i> (%)	Autor
PL	Kark.	203/163	88 (54)	65 (40)	10 (6)	Kwiatek et al., 1990
USA	Kark.	98/31	31 (100)	k.A.	k.A.	Jones et al., 1991b
SF	Kark. gfr.	199/14	14 (100)	k.A.	k.A.	Aho u. Hirn, 1988
D	Fleisch	2016/564 *	k.A.	k.A.	k.A.	Atanassova et al., 1998
IRL	Fleisch	120/45 **	18 (40)	14 (31)	k.A.	Madden et al., 1998
J	Fleisch	72/33	33 (100)	k.A.	k.A.	Ono u. Yamamoto, 1999
OA	Fleisch	100/77	45 (59)	30 (39)	2 (2)	Osano u. Arimi, 1999
I	Brust	32/12	9 (75)	3 (25)	k.A.	Zanetti et al., 1996
D/NL/F	Brust	1853/619	607 (98)	12 (2)	k.A.	Geilhausen et al., 1996
GB	Brust	198/165	156 (77)	13 (7)	k.A.	Kramer et al., 2000
USA	Flügel fr.	94/78	78 (100)	k.A.	k.A.	Kinde et al., 1983
IRL	Flügel fr.	153/99 ***	45 (45)	25 (25)	-	Flynn et al., 1994
CH	Leber fr.	139/43	33 (77)	10 (23)	k.A.	Baumgartner et al., 1995
CH	Leber gfr.	144/22 ****	12 (54)	9 (40)	k.A.	Baumgartner et al., 1995
RCH	Leber gfr.	126/117	25 (21)	92 (79)	-	Fernández u. Pisón, 1996

CH= Schweiz; D= Deutschland; F= Frankreich; GB= Großbritannien; I= Italien; IRL= Irland; J= Japan; NL= Niederlande; OA= Ostafrika; PL= Polen; RCH= Chile; SF= Finnland

*= keine Speziesbestimmung

**= keine Speziesbestimmung: 13 (29%) Isolate

***= *C. jejuni* subsp. *doylei*: 3 (3%); *C. fetus* subsp. *fetus*: 2 (2%);

C. cryaerophila: 3 (3%); keine Speziesbestimmung: 21 (21%) Isolate

****= *C. jejuni* + *C. coli*-Gemischtkontamination: 1 (6%)

k.A.= keine Angabe; Kark.= Karkasse; fr.= frisch; gfr.= gefroren

Tab. 8: Vorkommen von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleisch (Handel) in Ländern der Europäischen Union mit Monitoring-Programmen (modifiziert nach EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2003)

Land	1999		2000		2001	
	Proben- anzahl	davon positiv (%)	Proben- anzahl	davon positiv (%)	Proben- anzahl	davon positiv (%)
Belgien	139	57,6	83	7,2	82	2,4
Dänemark	994	34,0	708	41,1	1896	29,5
Deutschland	659	23,9	958	19,5	1058	14,5
Finnland	147	4,1	161	10,6	101	22,8
Irland	k.A.	k.A.	391	38,9	151	12,6
Niederlande	859	23,5	1454	30,5	1578	32,5
Österreich	k.A.	k.A.	200	20,0	172	32,6
Schweden	94	24,5	858	9,3	79	11,4

k.A.= keine Angabe

2.8.3 Campylobakteriose des Menschen

Bei der Campylobacterinfektion handelt es sich um eine Zooanthroponose mit weltweiter Verbreitung. *Campylobacter* spp. sind in Entwicklungsländern sowie in einigen industrialisierten Ländern (USA, Großbritannien, Schweden, Niederlande) mittlerweile vor den Salmonellen die häufigsten Verursacher für bakterielle Enteritiden (MEAD et al., 1999; SVENUNGSSON et al., 2000; DE WIT et al., 2001; TAM, 2001).

In Europa und Nordamerika treten diese Erkrankungen im Zeitraum von Frühsommer bis Herbst vermehrt auf (SKIRROW, 1987; KAPPERUD und AASEN, 1992; ROBERT-KOCH-INSTITUT-RKI, 2001). Vermutlich beruht diese Erscheinung auf saisonalen Schwankungen der Erregerdichte im Intestinum von Schlachttieren und synchron dazu in der Umwelt (z. B. Zugvögel, Nagetiere, Insekten) (JAKOBS-REITSMA, 1994; KIST, 2002).

Seit Januar 2001 besteht in Deutschland im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes (§ 7 IfSG) eine spezifische Meldepflicht für Nachweise darm-pathogener *Campylobacter*-Spezies, sofern eine akute Infektion anzunehmen ist (ROBERT-KOCH-INSTITUT-RKI, 2001). Demnach stand die Campylobakteriose im Jahr 2003 mit 47.876 gemeldeten Fällen an zweiter Stelle hinter den Salmonellosen mit 63.044 gemeldeten Fällen bei den bakteriellen Darminfektionen (ROBERT-KOCH-INSTITUT-RKI, 2004). Die thermophilen *C. jejuni* mit Raten bei Klinikisolaten bis zu 80% und *C. coli* (ca. 10-20%) gelten dabei

als dominierende Spezies unter den Verursachern (HEALING et al., 1992; ALLOS und BLASER, 1995).

Lebensmittel stellen das größte Risiko für Menschen dar, sich mit *Campylobacter* spp. zu infizieren (OOSTEROM, 1985). Amerikanische Untersuchungen besagen, daß die Übertragung zu 80% über Lebensmittel erfolgt (MEAD et al., 1999). Unzureichend erhitztes oder rekontaminiertes Geflügelfleisch und -innereien können als hauptsächliche Infektionsquelle angesehen werden (BERNDTSON et al., 1992; HUMPHREY et al., 1993; BRYAN und DOYLE, 1995). Sowohl auf dem Fleisch als auch auf den eßbaren Nebenprodukten der Schlachtung (Leber, Magen, Herz) kommen *Campylobacter* spp. in Zahlen um $10^2/g$, gelegentlich jedoch bis $>10^5/g$ vor. Infolge des hohen Feuchtigkeitsgehaltes dieser Produkte können die Keime gut überleben und zum Verbraucher gelangen. Besonders ungenügende Küchenhygiene spielt bei der Übertragung von *Campylobacter* spp. auf den Menschen eine bedeutende Rolle. Dabei kann es bei der Verarbeitung von rohen Geflügelfleisch und anschließender Zubereitung von anderen Lebensmitteln wie z.B. Salat zu Kreuzkontaminationen kommen. HARRIS et al. (1986) konnten Verbindungen zwischen Infektionen und ungewaschenen Schneidebrettern in der Küche herstellen. Vergleiche von humanen Isolaten mit Isolaten aus dem Geflügelfleisch auf Stammebene unter der Verwendung von Typisierungsmethoden wie PFGE oder AFLP sowie anderen Methoden konnten eine hohe genetische Klonalität aufweisen (ON et al., 1998; DUIM et al., 1999; NADEAU et al., 2002). Weitere Infektionsquellen sind Rohmilch bzw. nicht pasteurisierte Milch und Milchprodukte sowie nicht gechlortes Trinkwasser, aber auch Rind- und Schweinefleisch (v.a. rohes Hackfleisch), Obst, Gemüse, Fisch und Meerestiere (FINCH und BLAKE, 1985; HUMPHREY und HART, 1988; WILSON und MOORE, 1996; PEABODY et al., 1997; ENGBERG et al., 1998; NEIMANN, 2001). Fäkal-orale Infektionen bei Mensch und Haustier (besonders durchfallerkrankte Welpen und Kätzchen) sind eher die Ausnahme, können aber auftreten (DEMING et al., 1987).

Die krankheitsauslösende Infektionsdosis (MID) ist gering und kann nur ≥ 500 Keime betragen (ROBINSON, 1981; BLACK et al., 1988). Ausbrüche sind selten erfaßt worden (Tab. 9). Hauptsächlich treten Einzelerkrankungen auf. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist möglich, kommt aber selten vor

(BLASER et al., 1981). Häufig erkranken Kindern unter 6 Jahren sowie junge Erwachsenen zwischen 15 und 34 Jahren (BLASER et al., 1983; KAPPERUD und AASEN, 1992; ROBERT-KOCH-INSTUT-RKI, 2001; TAM, 2001). Auch Säuglinge, ältere Menschen und immunsupprimierte Patienten (z.B. AIDS) sind gefährdet (SORVILLO et al., 1991; TAUXE, 1992).

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 2-5 Tagen beginnt die Diarrhoe (BRYAN und DOYLE, 1995). Pathogenetisch ist die Campylobakteriose durch Enteroinvasivität charakterisiert (BUTZLER und SKIRROW, 1979). Durch die Invasion der Keime in die Mukosa von Jejunum, Ileum und Kolon können Entzündungen entstehen. Akute *Campylobacter*-Infektionen verlaufen in der Regel als selbstlimitierende Enteritis mit einer Dauer von 2-10 Tagen, begleitet von Fieber, Abdominalschmerzen bzw. -krämpfen, Erbrechen und wässrigem Stuhl mit teilweise Blutbeimengungen. Bakteriämie, Endokarditis, Meningitis, Pankreatitis, septischer Abort und neonatale Sepsis können zusätzlich als extraintestinale Begleiterkrankungen auftreten (SKIRROW und BLASER, 1995; KIST, 2002).

Wichtigste postinfektiöse Komplikationen sind das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), reaktive Arthritis und das Reiter Syndrom (KEAT und ROWE, 1991; PETERSON, 1994; REES et al., 1995; SMITH, 2002). Aufgrund der schweren Spätfolgen mit potentiell lebensbedrohlichem Verlauf hat das GBS die größte medizinische Bedeutung. Diese Autoimmunerkrankung des peripheren Nervensystems, bei der die Myelinscheiden der Nervenzellen zerstört werden (demyelinisierende Polyradikuloneuropathie), geht mit aufsteigenden motorischen Lähmungen und Parästhesien einher (HUGHES et al., 1999; SMITH, 2002). Zum Tod infolge einer *Campylobacter*-Erkrankung kommt es jedoch selten (TAUXE, 1992).

In den Stuhlproben lassen sich *Campylobacter* spp. 2-7 Wochen nach Infektion nachweisen. Eine lange Ausscheidung ist ebenfalls selten (ANONYMUS, 1995a) und tritt meist nur bei Immundefizienz auf (z. B. bei AIDS-Patienten). Therapiert wird in der Regel mit diätetischen Maßnahmen wie Wasser- und Elektrolytersatz. In sehr schweren Erkrankungsfällen erfolgt die Behandlung mit Erythromycin, Tetrazyklin und Chinolonen (Gyrasehemmer). Gegen letztere wird eine zunehmende Resistenzentwicklung beobachtet (ROBERT-KOCH-INSTITUT-RKI, 2001).

Tab. 9: Campylobakteriose-Fälle des Menschen in der Europäischen Union (Daten basieren nur auf Labor-Isolaten) 1996-2001(modifiziert nach EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2003)

Land	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Belgien	4991	5617	6610	6521	6682	7357
England u. Wales	43.240	50.201	58.058	56.451	55.888	55.798
Frankreich *	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	378	203
Griechenland	16	26	136	15	3	386
Irland	646	943	1318	2085	1613	1286
Luxemburg	129	106	k.A.	171	k.A.	288
Niederlande	3737	3661	3489	3175	3474	3682
Nordirland	653	778	775	862	1001	885
Schottland	5218	5528	6375	5861	6482	5435
Spanien	3557	3711	4328	5101	6113	6149

*= kein Meldesystem

k.A.= keine Angabe

2.8.3.1 Pathogenese der Campylobacteriose

Die Pathogenese der Campylobacterinfektion ist noch nicht vollständig geklärt. Zu den wichtigsten Virulenzfaktoren zählen die Motilität, Adhäsion, Invasion, Toxinbildung und Variabilität der Oberflächenantigene von *C. jejuni* und *C. coli*. Die Erreger besitzen eine monopolare Geißel, welche Voraussetzung für ihre Beweglichkeit ist. Chemotaktisch gesteuert können sie so dank ihrer Spiralform und korkenzieherartigen Bewegung den viskösen Darmschleim passieren, in Kontakt zur Darmschleimhaut gelangen und am Epithel von Jejunum und Kolon adhären (LEE et al., 1986; NACHAMKIN et al., 1993). L-Fucose hat dabei neben L-Serin und Muzin eine positive chemotaktische Wirkung auf die Keime (HUGDAHL et al., 1988).

Für die Adhäsion sind wahrscheinlich neben Geißelassozierten Adhäsinen eine Reihe von Lipopolysacchariden und OMPs (outer membrane proteins), darunter die Proteine PEB₁ und CadF, verantwortlich (NEWELL et al., 1985; MCSWEEGAN und WALKER, 1986; KONKEL et al., 1997; PEI et al., 1998).

Die Invasion erfolgt vermutlich nach mikrobieller De-novo-Synthese von invasionsassoziierten Proteinen sowie nach wirtszelleigener Signaltransduktion (KONKEL et al., 1999).

Die Rolle der Toxinbildung von *C. jejuni* und *C. coli* für die Pathogenese noch nicht geklärt. Es wird zwischen Enterotoxinen und Zytotoxinen unterschieden. Zu den wichtigsten zählen das Zytotoxin CDT („cytolethal distending Toxin“) und das cholera-ähnliche Toxin CLT („cholera-like toxin“) (MCCARDELL et al., 1984; PICKETT et al., 1996; WASSENAAR, 1997). Sie sind wahrscheinlich verantwortlich für intestinale Gewebeschädigung und Durchfall sowie Entzündungsreaktionen des Organismus (MANDAL et al., 1984; LINDBLOM et al., 1989). In Untersuchungen von Campylobakteriose-Patienten konnten z.B. toxinbildende *C. jejuni*-Stämme wesentlich häufiger in Begleitung von Durchfallerscheinungen gefunden werden, als bei symptomlosen Ausscheidern (RUIZ-PALACIOS et al., 1983).

Ein weiterer Virulenzfaktor sind die genetisch hochgradig variablen Lipopolysaccharide der äußeren Membran. Sie spielen eine Rolle bei Adhäsion und Enterotoxizität (MCSWEEGAN und WALKER, 1986). Die Oberflächenpolysaccharide einiger *C. jejuni*-Stämme besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Gangliosiden humaner Nervenzellen. Dies läßt einen Zusammenhang mit der Pathogenese des Guillain-Barré-Syndroms vermuten (ASPINALL et al., 1994).

Weitere wichtige Eigenschaften im Hinblick auf die Pathogenität sind die Fähigkeiten von *Campylobacter* spp., Hämin und Hämoglobin des Wirtes zu verwerten (PICKETT et al., 1992), über ein Superoxidschutzsystem enzymatisch toxische Sauerstoffverbindungen abzubauen (PARK, 2002) und sich über Temperaturregulations- sowie Hitzeschockproteine wechselnden Umgebungstemperaturen anzupassen (KIST, 2002).