

5 Diskussion der Ergebnisse

In Entwicklungsländern und einigen Industrienationen steht die *Campylobacteriose* mittlerweile vor der Salmonellose an erster Stelle bei den bakteriellen Enteritiden (ANONYMUS, 2000b; SVENUNGSSON et al., 2000; DE WITT et al., 2001; TAM, 2001). Dabei waren vor allem *C. jejuni* gefolgt von *C. coli* die Verursacher dieser Magen-Darm-Erkrankung (NIELSEN et al., 1997, ANONYMUS, 1999, NADEAU et al., 2002). Speziell Mastgeflügel gilt als Reservoir, ohne daß die Tiere klinisch erkranken (ANNAN-PRAH und JANC, 1988; GLÜNDER et al., 1988). Die zentrale ätiologische Rolle von rohen oder ungenügend erhitzten Geflügelfleisch und -produkten bei der *Campylobacteriose* des Menschen ist in zahlreichen Studien beschrieben worden (HARRIS et al., 1986; SKIRROW und BLASER, 1992; ATABAY und CORRY, 1997; ALTEKRUSE et al., 1998; FRIEDMAN et al., 2000; NADEAU et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. bei Hähnchen in der Mast untersucht werden. Darüber hinaus sollten in der Schlachtung Eintrag und Kreuzkontaminationen durch positive Herden analysiert sowie herdenspezifische Klone von der Mast über die Schlachtung bis hin zu den Endprodukten verfolgt werden. Im Rahmen dieses Zieles wurden Hähnchenherden von Mästern aus verschiedenen Regionen über den Zeitraum von Dezember 2001 bis August 2002 untersucht. Darüber hinaus wurden Herden dieser Mäster, welche in direkter Folge geschlachtet wurden, in einem Schlachtbetrieb an ausgewählten Stationen vor, während und nach der Schlachtung bis hin zu den Endprodukten beprobt. Für die Erfassung epidemiologischer Zusammenhänge wurde eine Auswahl der gewonnenen Isolate aus Mast und Schlachtung mit Hilfe einer molekularbiologischen Fingerprintmethode, der Pulsfeld-Gelelektrophorese, genotypisch feindifferenziert.

5.1 Mast

5.1.1 Probenahme-Bedingungen

Die Anzahl von 10 Kottupferproben war für den Nachweis einer *Campylobacter*-Infektion der Herden ausreichend. Auch in anderen Untersuchungen wurden 5-

10 Kottupfer pro Herde genommen, um eine Belastung mit *Campylobacter* spp. festzustellen (JACOBS-REITSMA et al., 1995b; BERNDTSON et al., 1996a; VAN DE GIESSEN et al., 1996; DENIS et al., 2001; WEDDERKOPP et al., 2001). Statistisch gesehen wird eine Herde unabhängig von der Größe bei einem minimalen Anteil von 25% infizierter Tiere mit einem Probenumfang von 10 Tieren praktisch sicher (zu 95%) als infiziert klassifiziert, d.h. mindestens ein beprobtes Tier wird dabei mit 95%iger Wahrscheinlichkeit erfaßt.

Für die Verfolgsuntersuchung von herdenspezifischen Stämmen wurde nur die erste und zweite Herde des jeweiligen Schlachttages beprobt, um eine Kreuzkontamination durch persistierende *Campylobacter* spp. von zuvor geschlachteten positiven Herden zu vermeiden.

Alle dafür in Frage kommenden Herden wurden zuvor in der Mast untersucht. Da der Betrieb B nach dem Rein-Raus-Prinzip wirtschaftete, konnten hier jeweils alle vier Herden in sechs direkt aufeinander folgenden Mastperioden untersucht werden. Dagegen wurde im Mastbetrieb A nach dem Rotationsverfahren eingestellt. Aus logistischen Gründen erfolgte die Auswahl der Herden dieses Betriebes nach den jeweiligen monatlichen Schlachterminen. Dadurch ergab sich eine unterschiedliche Anzahl an beprobten Herden pro Monat.

5.1.2 Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. bei Hähnchenherden in der Mast

In der Mast waren von 51 untersuchten Herden 45,1% mit *Campylobacter* spp. belastet. Diese Nachweisrate ähnelte dem Resultat einer dänischen Studie, in der 43% der untersuchten Geflügelherden eine *Campylobacter*-Belastung aufwiesen (WEDDERKOPP et al., 2001). Untersuchungen in anderen europäischen Nachbarländern, wie z.B. Großbritannien, Frankreich, Schweden und Niederlande haben ebenfalls die weite Verbreitung von *Campylobacter* spp. beim Mastgeflügel mit Infektionsraten zwischen 27% und 76% beschrieben (HUMPHREY et al., 1993; BERNDTSON et al., 1996a; VAN DE GIESSEN et al., 1996; REFRÉGIER-PETTON et al., 2001).

Die *Campylobacter*-Prävalenzen in den beprobten Herden lagen bei 0% oder 100%. Diese Daten befinden sich in Übereinstimmung mit denen von JACOBS-REITSMA et al. (1994b) und FLUCKEY et al. (2003), welche ebenfalls

Isolierungsraten von 0% oder 100% bei den untersuchten Geflügelherden erzielten.

Für den Untersuchungszeitraum von Dezember bis August konnte nachgewiesen werden, daß das Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. in den Hähnchenherden saisonalen Schwankungen unterworfen war. Während in den Wintermonaten Dezember bis Februar keine *Campylobacter* spp. isoliert werden konnten, lagen die Isolierungsraten im Zeitraum von Juni bis August bei jeweils 100%. Diese Ergebnisse decken sich unter anderem mit Untersuchungen in den Niederlanden, Schweden und Dänemark, bei denen ebenfalls ein deutlicher Anstieg der *Campylobacter*-Belastung bei Hähnchenherden während der Sommermonate Juni bis September auftrat (JACOBS-REITSMA et al. 1994b; BERNDTSON et al., 1996a; WEDDERKOPP et al., 2001). Eine Studie aus England konnte dagegen keine Saisonalität feststellen (HUMPHREY et al., 1993). Allerdings stand dies im Widerspruch zu anderen Arbeiten aus England, welche über saisonale Schwankungen referierten (WALLACE et al., 1997; NEWELL et al., 1999).

Die Ursachen für die Saisonalität sind noch nicht eindeutig geklärt. Neben Temperatur- und UV-abhängiger Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt (KIST, 2002) wird auch das jahreszeitliche Wanderverhalten der Zugvögel für ein saisonales Auftreten von *Campylobacter* spp. verantwortlich gemacht. Saisonale Schwankungen der Erregerdichte im Intestinum von Mastgeflügel wurden auch in anderen Arbeiten mit dem jahreszeitlich unterschiedlich starken Vorkommen von *Campylobacter* spp. in der Umwelt (z. B. Zugvögel, Nagetiere, Insekten) in Zusammenhang gebracht (JAKOBS-REITSMA, 1994; KIST, 2002). In den untersuchten Ställen herrschte aufgrund der geschlossenen Stallhaltung über das ganze Jahr ein relativ gleichbleibendes Klima mit Lufttemperaturen zwischen 21°C und 34°C sowie Luftfeuchtigkeiten bis ca. 70%. Dieses Milieu bot zwar gute Bedingungen zum Überleben von thermophilen *Campylobacter* spp., hatte aber offenbar keinen signifikanten Einfluß auf das Auftreten der Keime in den Herden.

Interessanterweise traten im März und Mai in den Betrieben A und B neben *Campylobacter*-negativen auch -positive Herden auf. Damit konnte nachgewiesen werden, daß trotz des Auftretens von infizierten Herden andere Ställe in der gleichen Mastanlage *Campylobacter*-frei bleiben können. Von vergleichbaren Ergebnissen berichten JACOBS-REITSMA et al. (1995b) und

BERNDTSON et al. (1996a), welche ebenfalls sowohl *Campylobacter*-belastete als auch unbelastete Herden zum Zeitpunkt der Schlachtung ermittelten. Darüber hinaus läßt dieses Resultat die Vermutung zu, daß ein Eintrag der Keime im März und Mai durch vertikale Übertragung über die Brütereien unwahrscheinlich gewesen ist, da bei beiden Betrieben die Eintagsküken aus den jeweils gleichen Brütereien eingestallt wurden. Im Falle eines *Campylobacter*-Eintrages aus der Brüterei wären mit hoher Wahrscheinlichkeit alle Herden infiziert gewesen. Besonders hervorzuheben ist hierbei der Mastbetrieb B, welcher nach dem Rein-Raus-Prinzip wirtschaftete und somit alle Eintagsküken zum gleichen Zeitpunkt einstellte. In der Literatur wurde überwiegend sowohl eine vertikale (Ovarien und Eier) als auch horizontale Übertragung über die Brütereien ausgeschlossen (SHANE et al., 1986; SHANKER et al., 1986; ANNAN-PRAH und JANC, 1988; VAN DE GIESSEN et al., 1992). Andere Autoren vermuten dagegen einen geringgradigen vertikalen *Campylobacter*-Eintrag über Eier in die Brütereien. So konnten PEARSON et al. (1996) gleiche Serotypen in den Geflügelherden und bei den Elterntieren nachweisen. Die Wege des Keimeintrages in die Herden sind bisher noch nicht geklärt worden. Es gibt aber genügend Hinweise auf epidemiologische Zusammenhänge zwischen herdenspezifischen Stämmen und *Campylobacter*-Stämmen aus der Umgebung der Ställe.

Eine horizontale Übertragung aus der bzw. in die Umgebung war bei den untersuchten Herden sehr wahrscheinlich. Die Ursachen hierfür können sehr vielfältig sein und häufig spielen dabei mehrere Faktoren, wie belebte und unbelebte Vektoren gleichzeitig eine Rolle.

Belebte Vektoren stellen unter anderem Wildvögel, Nager, Haustiere aber auch Insekten dar, welche potentielle Keimträger sein können (DEMING et al., 1987; ANNAN-PRAH und JANC, 1988; GLÜNDER et al., 1988; KAPPERUD et al., 1993; BERNDTSON et al. 1996b; GREGORY et al., 1997). Auf den Betriebsgeländen bzw. in den Ställen der untersuchten positiven Mäster konnten neben Wildvögeln und Mäusen auch Getreidekäfer und Fliegen beobachtet werden. Darüber hinaus befanden sich auf dem Gelände des Mastbetriebes A Hunde, während beim Mastbetrieb B eine Katze auf dem Betriebsgelände gehalten wurde.

Durch Personal kann ebenfalls ein Eintrag von *Campylobacter* spp. in die Herden erfolgen (LINDBLOM et al., 1986; ANNAN-PRAH und JANC, 1988; GREGORY et al. 1997). Weitere potentielle Keimeinträger können Fänger darstellen. Für die Betriebe A und B waren gleiche Greifergruppen zuständig, so daß hier zwischen den Betrieben eine Kreuzkontamination möglich war. Dabei erfolgte der Eintrag in die Herden möglicherweise über kontaminiertes Schuhwerk oder Hände.

Als einer der Hauptrisikofaktoren wird in der Literatur die nicht sachgemäße Benutzung der Desinfektionsmatten zur Stiefeldesinfektion genannt (PEARSON et al., 1987; KAPPERUD et al., 1993; EVANS und SAYERS, 2000).

In den untersuchten Betrieben wurden Hygienemaßnahmen vor Betreten der Ställe unterschiedlich gründlich durchgeführt. Während in den Mastbetrieben A und C vor Betreten der Ställe jeweils Kittel und Stiefel gewechselt wurden, erfolgte im Betrieb B weder ein Stiefel- noch ein Kittelwechsel. Darüber hinaus wurden im Betrieb A für jeden Stall eigene Arbeitsgeräte verwendet, welche jeweils auch dort belassen wurden. Im Betrieb B wurden dagegen gleiche Arbeitsgeräte in verschiedenen Ställen eingesetzt. Desinfektionswannen bzw. -matten waren bei allen Mästern vorhanden und wurden vor Betreten der Ställe genutzt. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß sich im Stiefelprofil Einstreu und Kotreste befanden, in denen möglicherweise die Keime überlebten und so erneut in die Herden eingetragen wurden.

Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse in Bezug auf das Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. bei den positiven Herden der Betriebe A und B erschien der Kittel- und Stiefelwechsel sowie die Nutzung stalleigener Arbeitsgeräte im Betrieb A keinen großen Vorteil erbracht zu haben. Die starke Belastung der Herden mit *Campylobacter* spp. vor allem in den Monaten Mai bis August lassen auf unzureichende Barrieren gegenüber dem Keimeintrag schließen. Ähnliche Resultate fanden sich in den Arbeiten von EVANS und SAYERS (2000), REFRÉGIER-PETTON et al. (2001) sowie WEDDERKOPP et al. (2001), welche ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang von intensiven Hygienemaßnahmen bzw. Reinigung und Desinfektion und dem Vorkommen von *Campylobacter* spp. in den Herden feststellen konnten.

Unbelebte Vektoren können unter anderem kontaminierte Einstreu, Futter und Tränkwasser sein.

In den untersuchten Betrieben wurden Stroh und Hobelspäne im trockenen Zustand während der Serviceperiode eingestreut, so daß diese dem Keim aufgrund ihrer geringen Wasseraktivität wenige Überlebenschancen boten. PEARSON et al. (1993) konnten in der frischen Einstreu (Hobelspäne) keine *Campylobacter* spp. nachweisen. Die Mistlagerung bei den Betrieben A und B erfolgte außerhalb des Geländes. Allerdings wurde beim Betrieb B der Mist in der näheren Umgebung unbehandelt ausgebracht, womit die Gefahr eines erneuten Keimeintrages über Wildvögel, Nager, Insekten etc. bestand.

Aufgrund der Empfindlichkeit von *Campylobacter* spp. gegenüber Trockenheit erschien das Geflügelfutter wegen seiner geringen Wasseraktivität als Kontaminationsquelle unbedeutend (HUMPHREY et al., 1993; JACOBS-REITSMA et al., 1995b). Darüber hinaus wurde es in der Verarbeitung (Pelletierung) auf Pasteurisationstemperaturen erhitzt.

Eine Analyse vom hauseigenen Brunnenwasser des Betriebes A auf Kontaminationen mit thermophilen *Campylobacter* spp. verlief negativ. Die untersuchten Herden waren dagegen zum Zeitpunkt der Probenahme alle positiv. Zusätzliche Untersuchungen der Leitungen bis hin zu den Nippeltränken im Stall wären jedoch erforderlich gewesen, um das Tränkwasser mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als Erregerquelle für diesen Betrieb ausschließen zu können. Aufgrund der begrenzten Ressourcen konnten diese jedoch nicht durchgeführt werden. Darüber hinaus können thermophile *Campylobacter* spp. in lebensfähigen nicht kultivierbaren Formen (viable but non-culturable, VNC) im Wasser vorkommen (ROLLINS und COLWELL, 1986; PEARSON et al., 1993), was in den eigenen Untersuchungen möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen geführt haben könnte. Andere Untersuchungen von TRACHOO et al. (2001) haben auch gezeigt, daß *Campylobacter* spp. in Biofilmen des Wasserleitungssystems persistieren können. Sogar aus Grundwasser wurden *Campylobacter* spp. isoliert (STANLEY et al., 1998), was eine weitere Kontaminationsgefahr für das Brunnenwasser darstellt.

Ein weiteres Infektionsrisiko stellte die Nähe des Betriebes A zum Schlachthof dar. Über das anfallende Brauchwasser, Schmutzpartikel etc. an der unreinen Seite im Bereich der Warte- und Entladeplätze für LKWs, war die Möglichkeit eines Keimeintrages in die Umgebung gegeben. BERNDTSON et al. (1996b) gelang der Nachweis von *Campylobacter* spp. im Abwasser eines Schlachtbetriebes.

Allgemein sind feuchte Milieus, wie z.B. Pfützen aber auch Flüsse und Seen eine mögliche Erregerquelle. HIETT et al. (2002) konnten *Campylobacter*-Stämme in stehendem Wasser aus unmittelbarer Umgebung des Stalles isolieren, welche klonal verwandt zu Isolaten aus dem Herdenkot waren. Pfützen sowie teilweise moderiger Untergrund waren bei den beprobten Mastbetrieben als mögliche Infektionsquellen vorhanden. Aber auch bei Sandproben aus der näheren Umgebung von Ställen konnten Kontamination mit *C. jejuni* und *C. coli* festgestellt werden (STUDER et al., 1999).

BERNDTSON et al. (1996a) konnten einen Bezug zwischen zunehmenden Herdengrößen und den Anstieg von *Campylobacter*-Infektionen herstellen. Sie vermuteten, daß dieser Zusammenhang mit einer stärkeren Versorgung bei größeren Herden mit Wasser, Futter, Einstreu, Luft und Arbeitsstunden verbunden sei. In den eigenen Untersuchungen bestanden die Herden aus 14.600 bis 29.700 Tieren mit Besatzdichten von 20 bis 21 Tieren pro m².

In Bezug auf die unterschiedlichen Bewirtschaftungsarten der positiven Betriebe A und B (Rotationsverfahren; Rein-Raus-Verfahren) konnten keine signifikanten Unterschiede bei der *Campylobacter*-Belastung der Herden festgestellt werden.

Um ein mögliches regionales Auftreten von *Campylobacter*-infizierten Tieren innerhalb des Stalles zu erfassen, wurden die Kottupferproben jeweils im Eingangsbereich sowie im mittleren und hinteren Stallbereich entnommen. Bei *Campylobacter*-Befall einer Herde waren generell alle 10 Kottupfer (100%) positiv. Insgesamt konnte dies bei allen 23 *Campylobacter*-positiven Herden ermittelt werden. Die Ergebnisse sprechen daher für eine schnelle und vollständige Verbreitung der Keime nach Eintrag in die Herde. Die rapide Ausbreitung der Keime innerhalb weniger Tage mit Infektionsraten von 100% in den Herden bis zur Schlachtung wurde auch von anderen Autoren beschrieben (SHANKER et al., 1990; JACOBS-REITSMA et al., 1994b, 1995b; BERNDTSON et al., 1996b; GREGORY et al., 1997; EVANS und SAYERS, 2000), zumal die minimale Infektionsdosis schon bei 35 Keimen (STERN et al., 1988) liegen kann. Die Ursache für diese schnelle Verbreitung ist noch nicht geklärt. Ein entscheidender Faktor scheint die hohe Dichte der Tiere in der Stallhaltung zu sein. Durch fäkale Verunreinigungen können die Keime auch in das Gefieder und auf die Haut gelangen. Dort überleben sie aber nur dann länger, wenn das Gefieder feucht ist. Auch die Koprophagie beim Geflügel ist ein möglicher

Faktor, der zur raschen Verbreitung innerhalb weniger Tage auf fäkal-oralem Wege beitragen kann. Weitere Vektoren für eine schnelle Verbreitung von *Campylobacter* spp. innerhalb des Stalles können kontaminiertes Wasser, Futter, Einstreu und sogar Luft sein (ENGVALL et al., 1986; SHANKER et al., 1990; EVANS, 1992). Eine Keimverbreitung kann aber auch über Käfer und Fliegen erfolgen.

5.1.2.1 Reinigung und Desinfektion in der Mast

Im Juni 2002 wurde eine einmalige Untersuchung von Stallböden nach Reinigung und Desinfektion in fünf Ställen des Mastbetriebes A durchgeführt. Alle beprobten Herden dieses Betriebes erwiesen sich zu dieser Jahreszeit als *Campylobacter*-positiv. Bei den im Eingangs-, Tränken-, Lüftungs- und Futtertrogbereich sowie im vorderen, mittleren und hinteren Stallbereich entnommenen Oberflächentupfern konnten keine thermophilen *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden. Eine Persistenz dieser Keime und eine damit verbundene Reinfektion neu eingestallter Herden nach Reinigung, Desinfektion und Trocknung war daher unwahrscheinlich. Gleiche Ergebnisse erhielten BERNDTSON et al. (1996a), welche ebenfalls von den Böden gereinigter Stallgebäude keine thermophilen *Campylobacter* spp. isolieren konnten.

5.1.2.2 Speziesverteilung innerhalb der gewonnenen Mast-Isolate

Bei den gewonnenen *Campylobacter*-Isolaten aus der Mast konnten in der Speziesdifferenzierung 76,1% *C. jejuni* und 23,9% *C. coli* zugeordnet werden. *C. lari* wurden nicht gefunden. DENIS et al. (2001) ermittelten in ihren Untersuchungen ähnliche Speziesverteilungen mit 74% *C. jejuni* und 26% *C. coli*. In anderen Arbeiten wurden Isolate vom Geflügel zu 66% bis 97% der Spezies *C. jejuni* bzw. zu 6% bis 34% der Spezies *C. coli* zugeordnet (JACOBS-REITSMA et al., 1994b; BERNDTSON et al., 1996a; WALLACE et al., 1997; WEDDERKOPP et al., 2001). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung haben damit die von anderen Veröffentlichungen propagierte Aussage bestätigt, daß beim Geflügel die Spezies *C. jejuni* dominiert, gefolgt von *C. coli* und *C. lari* (SHANE, 1992; TAUXE, 1992; SHANE, 2000, ANONYMUS, 1999; PETERSEN et al., 2001; NADEAU et al., 2002).

Ein Problem der Speziesbestimmung lag allerdings darin, daß nur die Hippurathydrolyse zur Unterscheidung von *C. jejuni* und *C. coli* angewendet

wurde. Diese Methode gilt jedoch nicht als ausreichend für eine eindeutige Zuordnung der Spezies (BARROS-VELÁZQUEZ et al., 1999). Es wurde bereits über das Auftreten von *C. jejuni*-Stämmen berichtet, bei denen die Hippurathydrolyse nicht nachgewiesen werden konnte (HEBERT et al., 1984; TOTTEN et al., 1987). Biochemisch als *C. coli* identifizierte Stämme konnten mittels PCR bzw. PCR-RFLP als hippuratnegative *C. jejuni*-Stämme erkannt werden (RAUTELIN et al., 1999; STEINBRUECKNER et al., 1999).

Daher sollte für die Konsolidierung der Speziesdifferenzierung zusätzlich eine molekulargenetische Methode verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit war dies aufgrund des zeitlichen und finanziellen Rahmens nicht bei allen Isolaten möglich. Bei Unsicherheiten in Bezug auf die Interpretation der Hippurathydrolyse wurde diese Untersuchung wiederholt. Darüber hinaus konnte die Spezieszugehörigkeit der mit der PFGE typisierten Isolate in nahezu allen Fällen anhand der kongruenten Fragmentmuster bestätigt werden. Auch YAN et al. (1991) haben in ihren Untersuchungen gezeigt, daß die PFGE-Analyse von *Sma*I-verdauter genomischer DNA ein hilfreiches Mittel zur intra-spezifischen Stammdifferenzierung ist.

Von allen 23 positiven Herden wurden bei 13 Herden nur *C. jejuni*, bei 8 Herden *C. jejuni* und *C. coli* sowie bei 2 Herden ausschließlich *C. coli* isoliert. Auffällig war das starke Auftreten von *C. coli* bei 2 Herden des Betriebes B im August. In anderen Untersuchungen konnten PETERSEN et al. (2001) ebenfalls in einer Geflügelherde überwiegend *C. coli* isolieren. *C. coli* dominiert üblicherweise bei *Campylobacter*-Infektionen von Schweinen (SKIRROW und BLASER, 1992; NIELSEN et al., 1997). KAPPERUD et al. (1993) konnte eine Korrelation zwischen Schweineproduktion und dem Vorkommen von *Campylobacter* spp. beim Geflügel herstellen. Eine Kreuzkontamination konnte in den eigenen Untersuchungen allerdings ausgeschlossen werden, da keine weiteren Nutztiere wie z.B. Schweine auf dem Gelände des Mastbetriebes B gehalten wurden.

4,6% der *C. jejuni*- und 25,5% der *C. coli*-Isolate aus der Hähnchenmast waren Nalidixinsäure-resistent. JAKOBS-REITSMA et al. (1994a) und GEILHAUSEN et al. (1995) haben vermehrt Nalidixinsäure-resistente Stämme der Spezies *C. jejuni* nachweisen können. Die in den letzten Jahren beobachtete Zunahme von Chinolon-Resistenzen bei *Campylobacter*-Stämmen und damit verbundene eingeschränkte Differenzierungsmöglichkeit anhand der Nalidixinsäure-

Sensibilität wurde in der Literatur beschrieben (ENDTZ et al., 1991; TENOVER et al., 1992; PIDDOCK, 1995). Darüber hinaus gibt die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber Fluorochinolonen zu denken, da diese ernsthafte Folgen für die antibiotische Behandlung der durch *Campylo-bacter* spp. verursachten Gastroenteritis haben könnte. MCDERMOTT et al. (2002) stellten einen Zusammenhang zwischen der Behandlung von Mast-geflügel mit Fluoroquinolonen und zunehmenden Resistenzen bei *C. jejuni* fest. In der Humanmedizin wurde ebenfalls vom verstärkten Auftreten chinolonresistenter *Campylobacter* spp. berichtet (SEGRETI et al., 1992; WRETLIND et al., 1992).

5.2 Schlachtung

5.2.1 Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. bei Hähnchen in der Schlachtung

Bei allen *Campylobacter*-positiven Herden waren die Kontaminationen an den einzelnen Schlachtstationen relativ hoch mit Isolierungsraten zwischen 91,1% und 100%. Beprobte wurden Transportkisten vor und nach Reinigung und Desinfektion, Schlachtkörper nach dem Brühen und im Anschluß an die Luftkühlung sowie Innereien und Endprodukte. Ähnliche Resultate erzielten ALTMEYER et al. (1985), welche bei positiven Herden in der Schlachtung an einzelnen Schlachtstationen jeweils nahezu 100%ige Kontaminationen ausmachen konnten. Darüber hinaus waren in den eigenen Untersuchungen nach Schlachtung positiver Herden generell alle untersuchten Prozeßwässer (Transportkistenwaschwasser, Betäubungsbad, Brühwasser, Wasser aus der Leber-Magen-Wanne) kontaminiert. Anderen Untersuchungen haben ebenfalls eine starke *Campylobacter*-Belastungen auf Geflügel-Karkassen an einzelnen Schlachtstationen und darüber hinaus auch auf Maschinen sowie im Brüh- und Kühlwasser nach der Schlachtung von positiven Herden beschrieben (OOSTEROM et al., 1983a,b; IZAT et al., 1988; BERNDTSON et al., 1992, 1996b; MEAD et al., 1995; HAFEZ et al., 2001).

Während die Isolierungsrate bei Schlachtkörpern nach dem Brühen bei 91,1% lag, war sie bei Tierkörpern nach der Luftkühlung und bei Endprodukten höher mit jeweils 96,7%. Dabei muß allerdings die unterschiedliche Probenahme (Tupferproben von Schlachtkörpern nach dem Brühen; Halshautproben von Schlachtkörpern nach der Luftkühlung; Hautproben vom Endprodukt) an den

jeweiligen Stationen berücksichtigt werden. Dennoch verdeutlichte dieses Ergebnis zum einen den starken Eintrag von thermophilen *Campylobacter* spp. in die Schlachtkette durch positive Herden und ließ zum anderen vermuten, daß während der Schlachtung keine signifikante Reduzierung von *Campylobacter*-kontaminierten Hähnchenkarkassen erfolgte. Auch FLUCKEY et al. (2003) konnten keine Abnahme von *Campylobacter*-Kontaminationen bei Hähnchenkarkassen während der Schlachtung feststellen.

Eine Keimbarriere war in der Schlachtkette scheinbar nicht vorhanden. Möglicherweise hat an einigen Stationen, wie z.B. Brühen oder Luftkühlung eine Reduzierung von *Campylobacter*-Kontaminationen der Karkassen stattgefunden. Diese Vermutung ließ sich jedoch nicht belegen, da in der vorliegenden Arbeit keine quantitativen Untersuchungen durchgeführt wurden.

Der *Campylobacter*-Eintrag und die Verbreitung während der Schlachtung ist vor allem auf das Entleeren bzw. das Eröffnen des Gastrointestinaltraktes sowie auf kontaminierte Haut und Federn positiver Tiere zurückzuführen. In dem untersuchten Schlachtbetrieb konnten Verschmutzungen des Betäubungs- und Brühbades durch Kot und Federn bzw. verschmutztes Gefieder der Karkassen festgestellt werden. Darüber hinaus wurden im Bereich der Eviszeration Rupturen der Darmpakete durch manuelle Entfernung beobachtet. Kontaminierte Hände des Personals haben möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Keimverbreitung gespielt.

Auch Aerosole bieten eine Möglichkeit für die Verbreitung thermophiler *Campylobacter* spp. innerhalb des Schlachtbetriebes, besonders in Bereichen des Rupfers und der Eviszeration (OOSTEROM et al., 1983a; MEAD und HINTON, 1989; WHYTE et al., 2001a). In dem untersuchten Betrieb konnten während der Schlachtung Bewegungen vom Kontrollpersonal zwischen Schlacht- und Eviscerationsraum beobachtet werden. Damit wurde möglicherweise eine Verbreitung der Keime z.B. über Aerosole gefördert.

Allgemein liegt eine Keimverschleppung von der unreinen Seite in die reine Seite durch Bewegungen des Kontrollpersonals zwischen den verschiedenen Bereichen nahe. Dabei wird der Keim möglicherweise über kontaminierte Schuhe, Kittel, Hände oder Arbeitsgeräte verschleppt.

Aufgrund dieser zahlreichen Kontaminationsmöglichkeiten war es unter den normalen Schlachtbedingungen im untersuchten Betrieb nahezu ausgeschlossen, eine Kreuzkontamination unbelasteter Herden zu verhindern.

5.2.1.1 Prozeßwässer

Transportkistenwaschwasser, Betäubungsbad, Brühwasser und Wasser aus der Leber-Magen-Wanne waren teilweise schon vor Schlachtbeginn und generell nach Durchlauf positiver Herden mit thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert. Auch Untersuchungen von WEMPE et al. (1983) haben gezeigt, daß ein Großteil der von ihnen untersuchten Prozeßwässer nach Schlachtung positiver Herden zu 100% mit *Campylobacter* spp. belastet war.

In der Schlachtung boten die Prozeßwässer den Keimen vermutlich aufgrund der Feuchtigkeit eine Möglichkeit zum Persistieren. Untersuchungen von OOSTEROM et al. (1983b) haben gezeigt, daß sich *Campylobacter* spp. nur von Oberflächen isolieren ließen, solange diese feucht waren. Dabei überlebten die Keime möglicherweise in Biofilmen. Eine protektive Wirkung kann auch organisches Material (z.B. Kotpartikel) liefern, welches durch Umschließen des Keimes einen Schutz vor äußeren Einflüssen bietet. Durch ständiges Anpassen an die Umwelt und damit verbundener genetischer Instabilität können *Campylobacter* spp. möglicherweise auch in lebensfeindlichem Milieu überleben (WASSENAAR et al., 1998).

Die Temperaturen der Prozeßwässer lagen bei Transportkistenwaschwasser, Betäubungsbad und Wasser aus der Leber-Magen-Wanne im Durchschnitt zwischen 15°C und 22°C. Das Brühwasser hatte Temperaturen von 50-53°C. Die Werte der Temperaturmessung besagten, daß eine Vermehrung von thermophilen *Campylobacter* spp. in den Prozeßwässern ausgeschlossen werden konnte, da eine Vermehrung nur in Temperaturbereichen von 32-45°C erfolgen kann (ANONYMUS, 1998). Allerdings haben die Ergebnisse der Probenahme gezeigt, daß ein Überleben der Keime bei diesen Temperaturen möglich war. Ein Persistieren von *C. jejuni* bei Temperaturen zwischen 4°C und 37°C für 17 Stunden in Wasser und Biofilmen wurde in der Arbeit von BUSWELL et al. (1998) beschrieben.

Die pH-Werte der Prozeßwässer lagen im Schnitt zwischen pH 6,4 und pH 8,3. Ein Persistieren von thermophilen *Campylobacter* spp. war bei diesen Werten möglich, da die Keime in Bereichen zwischen pH 4,9 und pH 9,0 überleben können (ANONYMUS, 1995a).

Beim Transportkistenwaschwasser konnte die Desinfektion vermutlich wegen unzureichender Konzentration bzw. in Kombination mit zu niedrigen Temperaturen (ca. 18-22°C) ein vollständiges Abtöten thermophiler

Campylobacter spp. nicht erreichen. Auf ähnliche Erkenntnisse kamen SLADER et al. (2002), welche ebenfalls *Campylobacter* spp. aus dem Transportkistenwaschwasser isolieren konnten und eine unzureichende Desinfektionswirkung auf die Temperatur des Wassers von 30°C zurückführten. Laut Herstellerangaben hätte die Wassertemperatur 40°C bis 80°C für eine optimale Desinfektionswirkung betragen müssen.

Das Brühbad gilt als einer der Hauptorte, an denen in der Schlachtung eine mögliche Kreuzkontamination bzw. Kontamination negativer Herden stattfinden kann (WEMPE et al., 1983; HUMPHREY und LANNING, 1987). Thermophile *Campylobacter* spp. wurden sowohl vor Schlachtung als auch nach Durchlauf positiver Herden im Brühwasser bei Temperaturen zwischen 50°C und 53°C detektiert. Vergleichbare Resultate hatten GENIGEORGIS et al. (1986), welche keinen signifikanten Einfluß der Brühtemperatur von 53°C auf das Vorkommen von *C. jejuni* im Brühwasser erkennen konnten. Darüber hinaus konnten sie sogar bei 60°C *Campylobacter* spp. aus dem Brühbad isolieren. OOSTEROM et al. (1983b) fanden D-Werte bei *C. jejuni* in Hühnerkot zwischen 0,18-0,39 Minuten bei 60°C und 1,96-10,82 Minuten bei 52°C. Da das Brühen in der eigenen Untersuchung ca. 3-4 Minuten betrug, ist das Überleben der Keime nicht überraschend. Auch WEMPE et al. (1983) stellten fest, daß sich die Isolierungsrate von *Campylobacter* spp. aus dem Brühwasser erhöht, wenn die Brühtemperatur auf 53°C gesenkt wird. Bei 60°C konnten sie keine *Campylobacter* spp. mehr isolieren. Möglicherweise werden die D-Werte von Bakterien im Brühwasser durch die Höhe des Eintrages von organischem Material beeinflusst.

Die Resultate der eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß thermophile *Campylobacter* spp. in den Prozeßwässern überleben konnten und damit das Risiko von Kreuzkontaminationen gegeben war. Weder Desinfektion im Transportkistenwaschwasser, elektrische Spannung im Betäubungsbad noch Temperaturen des Brühwassers erwiesen sich als eine wirksame Barriere gegen eine Persistenz von thermophilen *Campylobacter* spp. Darüber hinaus waren die kontaminierten Prozeßwässer vor Schlachtbeginn ein Indiz für eine mangelhafte Reinigung und Desinfektion der Anlagen.

5.2.1.2 Schlachtstationen

Transportkisten

Bei allen positiven Herden konnte eine Kontamination der Transportkisten sowohl vor als auch nach Reinigung und Desinfektion festgestellt werden. Die Isolierungsrate thermophiler *Campylobacter* spp. betrug zum Zeitpunkt der Anlieferung 98,9%. Nach Reinigung und Desinfektion lag sie immer noch bei 91,1%. Eine mangelhafte Transportkistenreinigung und -desinfektion im Geflügelschlachtbetrieb wurde auch von SLADER et al. (2002) festgestellt, welche *Campylobacter* spp. von Kisten direkt nach Reinigung und Desinfektion isolieren konnten. Auch BERNDTSON et al. (1996b) und VAN DE GIESSEN et al. (1998) konnten *Campylobacter* spp. von Transportkisten vor Reinigung und Desinfektion und darüber hinaus auch von Fahrzeugen isolieren.

Nach Durchlauf durch die Kistenwaschanlage zeigte sich in der eigenen Untersuchung, daß die mechanische Reinigung unzureichend war. Häufig fanden sich auf dem Boden, besonders in den Rillen und Ecken, Kotreste, welche durch den Reinigungsvorgang nicht entfernt worden waren. Tupferproben von diesen Kotresten fielen *Campylobacter*-positiv aus. SLADER et al. (2002) fanden ebenfalls größere Mengen an organischen Material auf Transportkisten nach Reinigung und Desinfektion.

Da auch das Transportkistenwaschwasser z.T. vor Schlachtung und generell nach Waschung von Kisten positiver Herden mit thermophilen *Campylobacter* spp. belastet war, lag eine zusätzliche Kontamination über dieses Prozeßwasser nahe.

Darüber hinaus wurden die Kisten im Anschluß an die Reinigung übereinander gestapelt. Dadurch bestand die Gefahr einer erneuten Kontamination von *Campylobacter*-unbelasteten Kisten durch ablaufendes Schmutzwasser.

Kontaminierte Transportkisten und LKWs bergen die Gefahr einer Kreuzkontamination bzw. eines Eintrages von *Campylobacter* spp. in die Herden, besonders bei der fraktionierten Schlachtung (NEWELL et al., 2001; BOXALL et al., 2001; SLADER et al., 2002). Diese wurde im Betrieb A durchgeführt.

Noch während des Transportes kann es zu oberflächlichen Kontaminationen bzw. Infektionen der Tiere durch *Campylobacter*-belastete Kisten kommen. Untersuchungen von STERN et al. (1995) haben gezeigt, daß nach dem Transport eine stärkere Oberflächenkontamination der Tiere mit *Campylobacter*

spp. auftreten kann als vorher. NEWELL et al. (2001) konnten den Nachweis von Kontaminationen negativer Schlachtchargen durch belastete Transportkisten erbringen. Untersuchungen von JACOBS-REITSMA und BOLDER (1998) zeigten ebenfalls, daß eine Infektion unbelasteter Tiere durch kontaminierte Kisten erfolgen kann und gereinigte Transportkisten z.T. häufiger mit *Campylobacter* spp. belastet sind als ungereinigte.

Brühen

Bei allen positiven Herden konnten im Anschluß an den Brühvorgang Kontaminationen der Karkassen mit thermophilen *Campylobacter* spp. festgestellt werden. Die Isolierungsrate war mit 91,1% relativ hoch. Untersuchungen von WEMPE et al. (1983) haben gezeigt, daß durch das Brühen der Schlachtkörper (auch bei unterschiedlich hohen Temperaturen wie 53°C oder 60°C) eine *Campylobacter*-Prävalenz auf den Endprodukten nicht beeinflußt wurde.

In den eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls kein Einfluß der Brüh-temperatur (ca. 50°C-53°C) auf die Kontamination der Endprodukte erkannt werden. Möglicherweise ist dies auf eine zu kurze Brühdauer zurückzuführen, die eventuell nur zu einer oberflächlichen Keimabtötung geführt hat, während *Campylobacter* spp. in den versteckten Hauttaschen nicht erreicht wurden. Allerdings haben andere Untersuchungen von IZAT et al. (1988) gezeigt, daß zumindest eine Reduzierung der *Campylobacter*-Kontamination auf der Geflügelhaut während des Brühens stattfinden kann.

Ein Grund für die äußere Kontamination wird in der Oberflächenbeschaffenheit der Geflügelhaut vermutet. Diese wird im Gegensatz zu anderen Tierarten während der Schlachtung nicht entfernt. Vor allem Federfollikel bieten dabei den Keimen einen Schutz zum Überleben. Es wurde aber auch festgestellt, daß mit der Erhöhung der Brüh-temperatur ein größerer Verlust des Stratum corneum der Hähnchenhaut verbunden ist, wodurch ein Anheften von Bakterien erleichtert wird (KIM et al., 1993).

Darüber hinaus werden im Bereich der Subkutis häufig Temperaturen unterhalb der Brüh-temperatur erreicht und somit ein Überleben von thermophilen *Campylobacter* spp. ermöglicht. YANG et al. (2001) haben in ihren Untersuchungen festgestellt, daß die Temperatur der Geflügelhaut im Brühbad ca. 3°C unterhalb der Wassertemperatur lag. Zusätzlich kann sich auch auf der

Haut ein schwer löslicher Biofilm aus Brühwasser und organischem Material bilden, in dem die Keime überleben.

Luftkühlung

Im Anschluß an die Luftkühlung wurden bei allen positiven Herden *Campylobacter*-Kontaminationen auf den Schlachtkörpern festgestellt. Die Isolierungsrate betrug 96,7%. Auf ein ähnliches Ergebnis kam eine schwedische Studie, bei der 95% der untersuchten Halshautproben nach der Kühlung mit *Campylobacter* spp. kontaminiert waren (BERNDTSON et al., 1996b).

Durch die Luftzufuhr erfolgte vermutlich aufgrund der höheren Sauerstoffspannung und Abtrocknung eine *Campylobacter*-Reduzierung sowie eine Hemmung der Keimvermehrung auf der Geflügelhaut. Trotzdem ist es wahrscheinlich, daß die Luftkühlung keine effektive Barriere für das Vermindern der Keimzahlen auf Werte unterhalb der minimalen Infektionsdosis darstellte. Untersuchungen von FLUCKEY et al. (2003) haben gezeigt, daß während der Luftkühlung keine signifikante Abnahme von *Campylobacter* spp. auf den Geflügelkarkassen stattfindet. Entscheidend für ein Überleben des Keimes ist möglicherweise die Geflügelhaut, deren Federfollikel sich während der Kühlung schließen und den Keimen Schutz vor Trockenheit bieten (BERNDTSON et al., 1992). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (DOYLE und ROMAN, 1982c; OOSTEROM et al., 1983a) scheinen *Campylobacter* spp. auch stabiler bzw. unempfindlicher gegenüber Abtrocknung geworden zu sein. Das könnte mit einem Abwehrsystem der Keime gegen den „oxidativen Streß“ zusammenhängen (PARK, 2002).

Im Anschluß an die Kühlung hatten die Endprodukte im Bereich der Subkutis Temperaturen von 4°C. In einigen Studien wurde beschrieben, 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). LEE et al. (1998) konnten sowohl bei Raumtemperaturen als auch bei Kühltemperaturen (4°C) nach Auftauprozessen eine Vermehrung von *C. jejuni* auf der Geflügelhaut nachweisen. In der Arbeit von WUNDT und KASPER (1982) ließen sich *Campylobacter* spp. noch nach einwöchiger Lagerung bei 4°C aus Geflügelfleisch isolieren.

Im Vergleich zum Brühen mit einer Detektionsrate von 91,1% war die Isolierungsrate am Ende der Schlachtung nach der Luftkühlung höher mit

96,7%. JONES et al. (1991a) konnten ebenfalls eine Erhöhung der Anzahl von *Campylobacter*-belasteten Karkassen während der Schlachtung feststellen. Allerdings beruhten die unterschiedlichen Isolierungsraten in den eigenen Untersuchungen möglicherweise auf den verschiedenen Probearten. Diese bestanden zum einen aus Tupferproben von Schlachtkörperoberflächen nach dem Brühprozeß und zum anderen aus Halshäuten von Tierkörpern nach der Luftkühlung.

Blinddärme

Während der Schlachtung wurden bei einigen Herden Blinddärme zum Zeitpunkt der Eviszeration entnommen und auf das Vorkommen thermophiler *Campylobacter* spp. untersucht. Es zeigte sich, daß die Isolierungsraten zwischen 30% und 70% lagen, während die Kottupferproben dieser Herden zu 100% kontaminiert waren. Die Ursache für dieses Resultat könnte in der Probenaufarbeitung gelegen haben. Zur Zeit gibt es noch keinen „Goldstandard“ für die Kultivierung von Kotproben. Für die Isolierung wurden Selektivmedien wie Preston-Anreicherung und Karmali entsprechend der ISO 10272 verwendet, welche normalerweise für die Untersuchung von Lebensmittelproben angewendet werden. Möglicherweise wurde zu viel Kot (ca. 1-2 g) in 10 ml Preston-Anreicherung gegeben, so daß aufgrund von Begleitkeimflora, organischem Material etc. ein Wachstum von thermophilen *Campylobacter* spp. unterdrückt wurde. Kottupferproben aus der Mast hatten durch den Transport im Cary-Blair-Medium möglicherweise einen Verdünnungseffekt, so daß weniger Kot in 10 ml Preston-Anreicherung gelangte.

Innereien und Endprodukte

Sämtliche Proben von Lebern, Mägen und Herzen, die abgepackt und fertig für den Handel waren, erwiesen sich bei den positiven Herden als mit thermophilen *Campylobacter* spp. (100%) kontaminiert. Ähnliche Resultate erzielten andere Untersuchungen mit Isolierungsraten bei Lebern zwischen 67% und 100% sowie Isolierungsraten bei Herzen zwischen 71% und 80% (OOSTEROM et al., 1983a; WEMPE et al., 1983; GENIGEORGIS et al., 1986; FERNÁNDEZ und PISÓN, 1996).

Bei den Endprodukten (Schlachtkörper, abgepackt für den Handel) betragen die Isolierungsraten 80% bis 100%. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den

Berichten anderer Arbeiten, bei denen die Isolierungsraten zwischen 80% und 90% lagen (ALTMAYER et al., 1985; BOLTEN et al., 1999; JORGENSEN et al., 2002). Nach Auswertungen von WALDROUP (1996) soll die Anzahl *Campylobacter*-kontaminierter Endprodukte (Schlachtkörper) in den letzten 20 Jahren zugenommen haben, was allerdings auch mit der Optimierung der Nachweismethoden zusammenhängen könnte.

Die pH-Werte der Innereien lagen im Schnitt bei den Lebern bei pH 6,2, bei den Mägen bei pH 6,4 und bei den Herzen bei pH 7,2. Die Schlachtkörper hatten Werte um pH 7,2. Anhand dieser Werte zeigte sich, daß ein Überleben thermophiler *Campylobacter* spp. möglich war, da die Keime pH-Werte in Bereichen von pH 4,9 bis 9,0 tolerieren (ANONYMUS, 1995a).

Die Kontamination der Schlachtkörper kann zwischen 10^2 und 10^6 Keimen/g liegen (GILL und HARRIS, 1984a; HOOD et al., 1988; BRYAN und DOYLE, 1995; CASON et al., 1997; STERN et al., 1999). Bei einer minimalen Infektionsdosis von 500 KbE ist damit die Gefahr für den Verbraucher sehr hoch, mit *Campylobacter* spp. infiziert zu werden, wenn das Geflügelfleisch nicht genügend erhitzt wird bzw. eine Kreuzkontamination durch unzureichende Küchenhygiene erfolgt.

Die Ergebnisse zeigten, daß während des Schlachtvorganges keine effektiven Barrieren gegen Kontaminationen von Schlachtkörpern sowie Innereien vorhanden waren. In den Sommermonaten Mai bis August waren sogar sämtliche Innereien und Endprodukte kontaminiert und gelangten so an den Verbraucher. Dieses Resultat spricht für einen hohen Keimeintrag in die Schlachtung während der warmen Jahreszeit. Ähnliche Resultate erzielten unter anderem WILLIS und MURRAY (1997) sowie ROSENQUIST und NIELSEN (1999), welche ebenfalls eine saisonale Schwankung in Bezug auf *Campylobacter*-Kontaminationen von Hähnchenprodukten im Handel feststellten.

5.5 Ergebnisse der Untersuchung mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese

5.5.1 Mast

In den Herden wurde jeweils eine Anzahl von ein bis drei Klonen ermittelt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten von NEWELL et al. (2001) und PETERSEN et al. (2001), welche ebenfalls ein bis drei unterschiedliche Subtypen pro Herde detektierten. Auch andere Studien haben gezeigt, daß

Geflügelherden z.T. nur mit einem oder wenigen Serotypen bzw. Genotypen kolonisiert werden (BERNDTSON et al., 1996a; JACOBS-REITSMA 1997; NEWELL et al., 2001).

Im Falle eines Auftretens von mehreren Stämmen dominierten in allen Herden ein bis zwei Klone. Gleiche Resultate erzielten WASSENAAR et al. (1998), welche in ihren Untersuchungen ebenfalls vorwiegend ein bis zwei dominierende Genotypen in Geflügelherden vorfanden. Die Ursache für die größere Stabilität einiger Klone gegenüber anderen Klonen lag möglicherweise in einer besseren Anpassung an die Umweltbedingungen, wie sie im Stall bzw. im Geflügeldarm vorherrschen. HÄNNINEN et al. (2001) wiesen auf lokal dominierende *C. jejuni*-Stämme hin, die bevorzugt Tiere kolonisieren oder Vorteile für ein Überleben in der Umwelt besitzen. In Untersuchungen von experimentell infizierten Herden konnten KOROLIK et al. (1998) sowie BARROW und PAGE (2000) feststellen, daß einige *C. jejuni*-Stämme in der Lage sind, dominant zu werden und damit andere Klone an der Kolonisation der Geflügelherden hindern bzw. diese verdrängen.

Neben dominanten Klonen konnten auch in nahezu allen Herden spezifische Stämme detektiert werden, welche ausschließlich in den jeweiligen Ställen auftraten. Daher lag hier die Vermutung nahe, daß diese Stämme aus unterschiedlichen Erregerreservoirs in die Herden eingetragen wurden. Bei der Bewertung der Klone als herdenspezifisch bzw. als dominant muß in Betracht gezogen werden, daß nur eine begrenzte Anzahl von fünf bis sieben Mastisolaten pro Herde genotypisiert werden konnte. Allerdings konnte das dominante Auftreten bestimmter Klone auch bei Proben aus der Schlachtung dieser Herden bestätigt werden.

In verschiedenen Mastperioden wurden jeweils identische Klone parallel in mehreren Herden detektiert. Diese waren vermutlich durch Kreuzkontaminationen zwischen den Herden oder aus dem gleichen Erregerreservoir in die Ställe eingetragen worden. NADEAU et al. (2002) kamen zu ähnlichen Resultaten, indem sie identische Klone bei Herden isolieren konnten, die zur selben Zeit in einem Betrieb gemästet wurden.

Ein Klon (Typ F) konnte sowohl im Betrieb A als auch im Betrieb B während unterschiedlicher Mastperioden detektiert werden. Dieses Ergebnis erbrachte den Nachweis, daß bestimmte Klone über geographische Distanzen hinweg zumindest für den Zeitraum eines Monats genetisch stabil bleiben können.

Ähnliche Resultate erzielten MANNING et al. (2001), welche ebenfalls identische Klone in verschiedenen Herden an unterschiedlicher Orten über Zeiträume von wenigen Tagen bis maximal einem Monat detektieren konnten. Die Vermutung lag nahe, daß hier eine Kreuzkontamination zwischen den Herden der Betriebe A und B vorlag. Eine weitere Möglichkeit besteht in einem gemeinsamen Erregerreservoir in der unmittelbaren Umgebung. Für beide Thesen sprechen die zeitnahe Probenahme im Juni und Juli. Darüber hinaus betrug die Entfernung zwischen den beiden Mastanlagen weniger als 10 km. Zudem waren beide Mäster Zulieferer des gleichen Schlachtbetriebes, d. h. es wurden die gleiche Fängertruppe und Transportfahrzeuge eingesetzt.

Weitere Möglichkeiten für den Keimeintrag sind vielfältig und bereits umfassend diskutiert worden (Kapitel: Vorkommen von thermophilen *Campylobacter* spp. bei Hähnchenherden in der Mast).

Im Betrieb B wurden Herden in direkt aufeinanderfolgenden Mastperioden untersucht. Der Nachweis von persistierenden Klonen konnte nicht erbracht werden. Ursache dafür könnte eine effektive Reinigung und Desinfektion der Ställe gewesen sein, so daß keine thermophilen *Campylobacter* spp. überleben konnten und der erneute Eintrag in die Herden von außen aus anderen Erregerreservoirs erfolgte.

5.5.2 Schlachtung

Im Schlachtbetrieb konnten nahezu alle Klone aus der Mast auch an einzelnen Stationen sowie aus Prozeßwässern nach Schlachtung positiver Herden isoliert werden. Damit gelang der Nachweis des Eintrages von thermophilen *Campylobacter* spp. in den Schlachtbetrieb durch positive Herden sowie die Verfolgung herdenspezifischer Stämme von der Mast über die Schlachtung bis hin zu Innereien (Leber, Magen, Herz) und Endprodukten, die abgepackt und fertig für den Handel waren. Ähnliche Resultate erzielten BERNDTSON et al. (1996), welche mittels Serotypisierung bzw. *fla* typing epidemiologische Zusammenhänge zwischen Herden-Isolaten aus der Mast und anschließenden Schlachtung (bis hin zu den Endprodukten) herstellen konnten. In anderen Untersuchungen konnten ebenfalls ursprünglich fäkale *Campylobacter*-Isolate unter Verwendung der *fla* typing-Methode auf den Endprodukten nachgewiesen werden (NEWELL et al., 2001; HIETT et al., 2002).

Viele Genotypen traten sowohl in der Mast als auch in der Schlachtung dominant auf. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß einige Stämme, besonders in der Schlachtung, robuster gegenüber den extremen äußeren Einflüssen (rapide Temperaturschwankungen, pH-Wert-Änderungen, Sauerstoffzufuhr, Abtrocknung etc.) waren als andere. Zu gleichen Resultaten kamen NEWELL et al. (2001), welche in ihren Untersuchungen ebenfalls einige Subtypen über die gesamte Schlachtkette isolieren konnten, andere dagegen nicht.

Bei der Transportkistenreinigung wurden gleiche Genotypen sowohl vor als auch nach Reinigung und Desinfektion von den Kisten isoliert. Diese Klone traten auch in der Mast auf. Somit konnte zum einen die Kontamination von Transportkisten durch positive Herden und zum anderen die unzureichende Reinigung und Desinfektion der Kisten nachgewiesen werden. HIETT et al. (2002) detektierten ebenfalls mittels *fla* typing herdenspezifische Klone aus der Mast auf Transportkisten.

Bei einigen Herden traten zusätzlich andere Genotypen auf den Transportkisten vor Reinigung und Desinfektion auf, welche zuvor nicht in der Mast detektiert wurden. Möglicherweise ließen sich diese Klone aufgrund der geringen Anzahl von genotypisierten Kottupfer-Isolaten in der Mast nicht ermitteln. Andererseits könnten auch herdenfremde Stämme auf den Kisten persistiert haben.

Sowohl herdenspezifische als auch unspezifische Genotypen der Transportkisten-Isolate wurden an mindestens einer weiteren Schlachtstation detektiert. Diese Ergebnisse demonstrierten sowohl den Keimeintrag als auch die Keimverschleppung in die Schlachtkette durch positive Herden. Gleiche Resultate erzielten HIETT et al. (2002), welche ebenfalls gleiche Klone zunächst von Transportkisten und anschließend von den Karkassen während der Schlachtung isolieren konnten.

Auf einigen Transportkisten wurden nach Reinigung und Desinfektion neben herdenspezifischen Typen auch andere Genotypen ermittelt. Diese konnten weder in der Mast noch auf Transportkisten vor Reinigung und Desinfektion detektiert werden. Möglicherweise war hier eine zusätzliche Kontamination der Kisten mit herdenfremden Stämmen erfolgt, welche in der Waschanlage persistierten.

Bei der Herde 8 (Juni) des Mastbetriebes A wurde ein zusätzlicher Typ (L) auf Transportkisten nach Reinigung und Desinfektion detektiert, welcher bei der direkt zuvor geschlachteten Herde 5 massiv in der Mast und Schlachtung auftrat. Es bestand daher die Möglichkeit, daß eine Kreuzkontamination vorlag. Allgemein konnte eine klonale Verwandtschaft zwischen Isolaten von Transportkisten nach Reinigung und Desinfektion und Stämmen aus dem Transportkistenwaschwasser, welche vor Schlachtbeginn isoliert wurden, nicht festgestellt werden.

Im Anschluß an die Luftkühlung wurden von einigen Karkassen neben herdenspezifischen Klonen auch unbekannte *Campylobacter*-Stämme isoliert, welche weder in der Mast noch an weiteren Schlachtstation ermittelt werden konnten. Das isolierte Auftreten dieser Klone läßt auf eine fremde Herkunft schließen. Zu vermuten ist, daß die Stämme in der Schlachtung persistierten und während der Kühlung eine zusätzliche Kontamination der Karkassen stattgefunden hat. Klone, welche nur einmalig detektiert werden konnten und vermutlich im Schlachtbetrieb persistierten, konnten aus Prozeßwässern vor Schlachtbeginn und an den Stationen der Transportkistenreinigung und Luftkühlung isoliert werden.

Bei den untersuchten Prozeßwässern (Transportkistenwaschwasser, Betäubungsbad, Brühwasser, Wasser aus der Leber-Magen-Wanne) zeigte sich der Eintrag von herdenspezifischen Stämmen besonders deutlich. In allen Untersuchungen konnten Klone aus der Mast auch nach Durchlauf der positiven Herden in Prozeßwässern detektiert werden. Ähnliche Resultate erzielten HIETT et al. (2002), welche Klone aus der Mast auch nach Schlachtung der Herden im Brühwasser fanden. Ebenso konnten NEWELL et al. (2001) identische Subtypen von Mast-Isolaten auch bei Stämmen aus dem Brühwasser nach Durchlauf der Herde ermitteln.

Bei allen Untersuchungen konnten während der Schlachtung gleiche Klone auf Karkassen bei jeweils zwei direkt aufeinander folgenden Herden isoliert werden. Dieses Auftreten identischer Stämme bei unterschiedlichen Herden ließ auf Kreuzkontaminationen während der Schlachtung schließen. Allerdings traten diese Stämme in den meisten Fällen zuvor bei beiden Herden in der Mast auf, so daß sich eine Kreuzkontamination nur vermuten ließ. NEWELL et al. (2001) konnten ebenfalls gleiche *fla* Typen bei aufeinander folgenden Herden während der Schlachtung ermitteln und vermuteten Kontaminationen innerhalb der

Schlachtkette. Gleiche Ergebnisse erzielten auch RIVOAL et al. (1999), welche eine Kreuzkontamination bei Geflügelkarkassen unterschiedlicher Herden innerhalb der Schlachtkette mittels *fla* typing nachweisen konnten. Auch MIWA et al. (2003) konnten unter Verwendung einer RAPD PCR-Methode eine Kreuzkontamination innerhalb der Schlachtung nachweisen, indem sie Genotypen von *C. jejuni* Kot-Isolaten einer positiven Herden bei einer im direkten Anschluß geschlachteten negativen Herde auf den Karkassen detektieren konnten.

5.5.3 PFGE-Methode

Allgemein ist eine epidemiologische Studie über längere Zeiträume bei thermophilen *Campylobacter* spp. problematisch, da diese die Fähigkeit besitzen, ihr Genom umzubauen (WANG und TAYLOR, 1990; TAYLOR, 1992; TAYLOR et al., 1992). WASSENAAR et al. (2000) berichteten über Änderungen von PFGE-Genotypen bei *Campylobacter* spp. innerhalb einer klonalen Linie.

Im Rahmen der epidemiologischen Fragestellung dieser Arbeit hat sich die Pulsfeld-Gelelektrophorese allerdings bewährt. Mit Hilfe dieser Genotypisierungsmethode konnte die Stammdiversität sowohl in den Mastbetrieben als auch im Schlachtbetrieb aufgezeigt werden. Darüber hinaus gelang die Verfolgung herdenspezifischer Klone von der Mast über die Schlachtung bis hin zu den Endprodukten. Aufgrund der geringen Zeitabstände zwischen den Probenahmen waren Veränderungen im Genom der Klone durch intra- und intergenomischen Rekombinationen, Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen unwahrscheinlich. WASSENAAR et al. (1998) stellten fest, daß in einem begrenzten geographischen und zeitlichen Rahmen gewonnene Isolate von unterschiedlicher Herkunft anhand der *Campylobacter*-Subtypisierung über identische Typisierungsmuster gemeinsamen, klonalen Ursprüngen zugeordnet werden können. MANNING et al. (2001) konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls bestätigen, daß Genotypisierungs-Methoden bei Kurzzeituntersuchungen eingesetzt werden können. Sie empfahlen den Einsatz von mindestens zwei unterschiedlichen Methoden.

Dennoch konnten bei den eigenen gewonnenen Isolaten Änderung des Genotypes in der ansonsten klonalen Nachkommenschaft nicht ausgeschlossen werden. Es gibt Hinweise auf eine Instabilität und damit verbundenen Änderungen im Fragmentmuster, wenn Streßfaktoren auf *Campylobacter* spp. einwirken (WASSENAAR et al., 1998). Dies war vor allem in der Schlachtung

der Fall, da der Keim dort extremeren Bedingungen, wie z.B. starken Temperaturschwankungen, Osmolarität, Sauerstoffspannung oder Nährstoffentzug ausgesetzt war. Kultivierung und längere Lagerung scheinen die Stabilität der Genotypen jedoch nicht zu beeinflussen (BURNENS et al., 1995). Bei der Betrachtung der Stammvielfalt, vor allem in der Schlachtung, mußte auch berücksichtigt werden, daß äußere Einwirkungen schlachtspezifischer Streßfaktoren auf den Keim zu einem Selektionsdruck geführt haben könnten und damit die Stammvielfalt möglicherweise eingeschränkt wurde. NEWELL et al. (2001) sowie ALTER und FEHLHABER (2003) konnten eine Abnahme der Stammdiversität und damit der Subtypenvielfalt bei *Campylobacter* spp. im Verlaufe der Schlachtung beobachten.

Darüber hinaus müssen die detektierten Genotypen immer im Zusammenhang mit der angewandten Isolierungsmethode und der damit verbundenen Verwendung bestimmter Selektivmedien gesehen werden. Durch die kulturelle Isolierungsmethode kann es zum eingeschränkten bzw. ausbleibenden Wachstum bestimmter Klone kommen, so daß nur einige besser wachsende Klone detektiert werden können. Auch NEWELL et al. (2001) vermuteten, daß in Abhängigkeit von der Anreicherung bestimmte Genotypen bevorzugt wachsen. Darüber hinaus wurde in der eigenen Untersuchung nur jeweils ein Isolat pro Probe gewonnen, was eventuell zu einer Einschränkung der Genotypenvielfalt geführt haben könnte.

Durch die Verwendung des zweiten Restriktionsenzym *KpnI* konnten klonale Verwandtschaftsbeziehungen bestätigt werden. Das Differenzierungspotential beider Restriktionsenzyme (*SmaI* und *KpnI*) war damit ausreichend. Auch GIBSON et al. (1997) konnten eine Erhöhung der Diskriminierungsstärke bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese durch die Verwendung von zwei Restriktionsenzymen (*SmaI* und *KpnI*) feststellen. Es sollten daher immer mindestens zwei Restriktionsenzyme eingesetzt werden (On et al., 1998), um genetische Instabilitäten von *Campylobacter* spp. zu erfassen.

Aufgrund von Zeit- und Kostengründen konnte allerdings nur von einer Auswahl von Stämmen (103 Isolate) der insgesamt 237 Isolate ein zweites Fingerprintmuster unter Verwendung des Restriktionsenzym *KpnI* erstellt werden.