
3 Eigene Untersuchungen (Teil 1): Versuche zum Nachweis von *Campylobacter jejuni/coli* in der Rohmilch von Erzeugerbetrieben

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Untersuchungsmaterial und Probennahme

In der Zeit von Juli bis November 1993 wurden am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern, Abteilung Lebensmittelhygiene, in Nürnberg insgesamt 508 Rohmilch- und Mastitisproben auf die Anwesenheit von *Campylobacter ssp.*, insbesondere auf *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, hin untersucht (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25 Art und Anzahl der auf *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* untersuchten Proben

Art der Probe	Anzahl
Viertelgemelk (Mastitisprobe)	122
Einzelgemelk	56
Bestandsmilch	329
Verdachtsprobe (Einzelgemelk)	1
Gesamt:	508

Die Proben wurden im Milcherzeugerbetrieb aus dem Hofbehälter (Planproben) oder von Tierärzten (alle übrigen Proben) gezogen. Als Transportgefäße wurden sterile Röhrchen mit Stabilisator „Ly 20“ benutzt.

Von der Probennahme bis zum Beginn der Untersuchungen vergingen meist 24, in seltenen Fällen auch 48 Stunden. Die in Tabelle 25 aufgelistete Verdachtsprobe war etwa zwei Stunden unterwegs.

Die Proben wurden bis zur Untersuchung nach Möglichkeit bei 4°C gekühlt.

3.1.2 Nährböden und Reagenzien

Nährböden und Reagenzien wurden nach Anweisung der Hersteller verwendet. Alle im Zuge dieser Arbeit verwendeten Nährböden, Anreicherungsmedien und Verdünnungsflüssigkeiten wurden in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellt und auf ihre Eignung überprüft.

Nachfolgend sind die Herkunft und die Zusammensetzung der verwendeten Nachweis- und Anreicherungsmedien, Reagenzien und sonstigen Materialien angegeben:

Anreicherungsmedium

- *Brucella-Bouillon*:
(Fa. DIFCO, Detroit/Michigan (USA))
 - 10 g/l Trypton,
 - 10 g/l Peptamin,
 - 1 g/l Dextrose,
 - 2 g/l Hefeextrakt,
 - 5 g/l Natriumchlorid,
 - 0,1 g/l Natriumbisulfit,
 - 2 Fläschchen Brucella-Selektiv-Supplement (SR83) pro Liter,
 - pH-Wert 7,0 bei 25°C.

Nachweismedien

- *Campylobacter-Selektivagar nach Skirrow*:
 - Campylobacter-Agar-Basis nach Skirrow (Fa. Merck 2248),
 - 5 - 7% defibriniertes Schafs- oder Pferdeblut,
 - Campylobacter-Selektivsupplement (Fa. Merck 2249).
- *Müller-Hinton-Blutagar* (Fa. Merck 105437):
 - 2 g/l Fleischinfus,
 - 17,5 g/l Caseinhydrolysat,
 - 1,5 g/l Stärke,
 - 13 g/l Agar-Agar,
 - 50 - 100 ml/l defibriniertes Blut,
 - pH-Wert 7,4 ± 0,2 bei 25°C.

Verdünnungsflüssigkeit

- *Gepuffertes Peptonwasser* (Fa. Merck 107228):
 - 1000 ml Aqua destillata,
 - 10 g Pepton, tryptisch verdaut,
 - 5 g Natriumchlorid,
 - 9 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O,
 - pH-Wert 7,2 bei 25°C.

Weitere Reagenzien und Materialien

- *Stabilisator „Ly 20“ (nach Heeschen et al., 1969):*
 - Ortho-Borsäure 50,00 g,
 - Kaliumsorbat 0,75 g,
 - Glycerin, 10,00 g,
 - Methylenblaulösung (1%ig) 0,50 ml,
 - Aqua dest. ad 1000,00 ml,
 - 1,18 ml je 10 ml Milch ($\pm 1,0$ ml),
 - Temperaturbereich: ca. 5°C - 20°C.
- *Gramfärbung:*
 - Grams Karbolgentianaviolettlösung (Fa. Merck 9216),
 - Lugol'sche Lösung (Fa. Merck 9261),
 - 96prozentiger Alkohol (Fa. Merck 972),
 - Safraninlösung (Fa. Merck 9217).
- *Katalasetest:*
 - 1 ml 30prozentige H₂O₂-Lösung (Fa. Merck 8597),
 - 10 ml Aqua destillata.
- *Cytochromoxidasetest:*
 - Oxidase-Test (Fa. bio Mérieux 7046).
- *Schaffung eines geeigneten Milieus für die Untersuchungen:*
 - Anaerobiertopf (Fa. OXOID HP11, BBL Gas Pak System[®]),
 - Katalysator (Fa. OXOID BR42),
 - Gas Generating Kit (Fa. bio Mérieux 96122, OXOID BR56).

3.1.3 Isolierung und Kultivierung von *Campylobacter ssp.*

264 Proben wurden über Direktausspatelung auf *Campylobacter*-Selektiv-Nährboden nach Skirrow untersucht.

Weitere 244 Proben wurden jeweils über Direktausspatelung auf *Campylobacter*-Selektiv-Nährboden nach Skirrow sowie parallel über *Campylobacter*-Anreicherungsmedium *Brucella Bouillon* mit anschließender Ausspatelung auf Selektiv-Nährboden nach Skirrow kultiviert.

3.1.3.1 Direktausspatelung

Jeweils 0,1 ml der aufgeschüttelten Probe wurden mit einem sterilen Drigalskispatel auf den Nährboden nach Skirrow verteilt. Die anschließende Bebrütung erfolgte in einem Anaerobiertopf mit Katalysator und Gas Generating Kit über 48 Stunden bei 42°C.

3.1.3.2 Anreicherung

10 ml Brucella Bouillon wurden mit 1 ml aufgeschütteltem Probenmaterial beschickt, 24 Stunden bei 37°C mikroaerophil bebrütet und 0,1 ml dieser Anreicherung gemäß Abschnitt 3.1.3.1 weiterbehandelt. Parallel zu den Milchproben wurde ein Referenzstamm mitgeführt.

3.1.3.3 Auswertung

Unmittelbar nach der Entnahme aus dem Anaerobiertopf wurden die Platten makroskopisch begutachtet. Dabei wurde nach Kolonien gesucht, die folgende Charakteristika aufweisen:

- flach-fließend, d.h. einzelne runde Kolonien mit einem Durchmesser von maximal 2 mm, von denen meist Schwärmmrasen ausgehen,
- grau bzw. bräunlich bis braunrosa,
- glänzend,
- rau und metallisch glänzend (ältere Kolonien).

Kolonien, die diese Bedingungen erfüllen, wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop weiter untersucht. Als typisch für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* gelten „s“- oder kommaförmig gewundene Stäbchen, die sich schnell und kornzieherartig bewegen.

Die weitere Differenzierung verdächtiger Kolonien erfolgte anhand des Gramverhaltens und biochemischer Tests.

Als gramnegative Erreger färben sich *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* rot an. Besonders geeignet zur Geißelfärbung ist Safranin. Unter dem Mikroskop war die oft polymorphe Erscheinung von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* gut erkennbar. In älteren Kulturen zeigten sich vor allem kokkoide Formen.

Der Katalasetest verlief positiv. Unmittelbar nach Zugabe von verdächtigem Koloniematerial in einen Tropfen Katalasereagenz auf dem Objektträger kam es zu feiner Gasblasenbildung. Auch der Oxidasetest war positiv. Sofort nach Verreiben von verdächtigem Koloniematerial auf das weiße Filterpapier zeigte sich ein Farbumschlag in ein tiefes Blau.

Campylobacter jejuni und *Campylobacter coli* bilden keinen Schwefelwasserstoff (H₂S). Dies wurde auf Kligleragar bei mikroaerophiler Bebrütung über 48 Stunden bei 42°C überprüft und bestätigt.

Zur endgültigen Unterscheidung zwischen *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* bietet sich die Hippurathydrolyse an. *Campylobacter jejuni* vermochte Hippurat zu spalten, *Campylobacter coli* nicht.

Eine Differenzierung in Biotypen und Serotypen fand nicht statt.

3.2 Ergebnisse

Von den 508 untersuchten Milchproben erwiesen sich alle 264 Direktausspatelungen als *Campylobacter*-negativ. Auch die 244 zusätzlich in *Brucella* Bouillon angereicherten und erst anschließend ausgespatelten Proben ließen keine Isolierung des gesuchten Erregers zu.

Auch in der Verdachtsprobe auf *Campylobacter jejuni/Campylobacter coli* konnte der Erreger nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 26 Auf *Campylobacter* untersuchte Milchproben

Art der Probe	Anzahl von Proben	Ergebnis
Viertelgemelk (Mastitisprobe)	122	negativ
Einzelgemelk	56	negativ
Bestandsmilch	329	negativ
Verdachtsprobe	1	negativ
Gesamt:	508	alle negativ

Häufig nachgewiesene Erreger waren Staphylokokken und Streptokokken. Aerobe Sporenbildner, Schimmel und Coliforme wiesen auf sekundäre Kontamination der Milch hin.

Oft bot sich makroskopisch bereits ein buntes Bild verschiedener Kolonieformen, -farben und -größen. Teilweise waren die Platten völlig überwuchert und nicht auswertbar.