
5 Eigene Untersuchungen (Teil 3): Versuche zur Reisolierung von *Campylobacter jejuni* aus experimentell mit hohen Keimzahlen inokulierter Milch

5.1 Material und Methodik

5.1.1 Untersuchungsmaterial und Probennahme

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich UHT-Milchen mit einem Fettgehalt von 1,5% im Tetra Pak[®] verwendet. Die Milchen wurden mit einem humanen *Campylobacter-jejuni*-Referenzstamm aus dem LUA Erlangen beimpft. Dieser Stamm war frei von kokkoiden Formen über die gesamte Versuchszeit.

5.1.2 Nährböden und Reagenzien

Wie unter Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Abweichend davon wurde das mikroaerophile Milieu jedoch mit dem neuen OXOID **CampyGen**[®] als Reagenz hergestellt.

Zur pH-Wert-Messung wurde das „Microprocessor pH-Meter pH-535 Multi Cal“ der Firma WTW verwendet, zur manuellen Koloniezählung das Gerät „BZG 25“, ebenfalls von der Firma WTW.

5.1.3 Isolierung und Kultivierung von *Campylobacter jejuni*

Wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

5.2 Reisolierung von *Campylobacter jejuni* nach experimenteller Inokulation in UHT-Milch

5.2.1 Versuchsaufbau und -durchführung

Originalpackungen UHT-Milch wurden unter sterilen Kautelen geöffnet.

Je 9 ml Milch wurden in autoklavierte Duranglasröhrchen, 14 cm lang, mit einem Außendurchmesser von 10 mm und Stopfen, pipettiert.

Jeweils 19 Röhrchen bildeten einen Versuchsansatz. Die experimentell kontaminierten Milchröhrchen wurden aerob und dunkel bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert (CHRISTOPHER et al., 1982a).

Nach zweitägiger mikroaerophiler Bebrütung bei 42 °C wurden von gut bewachsenen Nährböden mehrere *Campylobacter-jejuni*-Kolonien mit einer sterilen Öse abgenommen und in 10 ml Brucella-Bouillon mit *Campylobacter*-Selektivsupplement eingimpft. Anschließend wurde die Bouillon 24 Stunden bei 37 °C mikroaerophil bebrütet. Mit UHT-Milch wurde dann eine dekadische Verdünnungsreihe hergestellt

und die Gesamtkeimzahl bestimmt. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 12 schematisch dargestellt.

Aus den sechs Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-6} wurden je drei vorbereitete Milchröhrchen mit je 1 ml verdünnter Keimsuspension beimpft, so daß sich für die jeweils drei Milchröhrchen einer Verdünnungsstufe bezogen auf die Bouillonkultur Endverdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} ergaben. Das 19. Röhrchen blieb als Negativkontrolle unbeimpft.

Alle 18 beimpften Probenröhrchen eines Versuchsansatzes wurden bei folgenden Temperaturen bis zu 36 Stunden inkubiert:

- Kühlschranktemperatur: 4 °C,
- Raumtemperatur: 22 °C,
- Brutschranktemperatur: 37 °C.

Für jede dieser Temperaturen wurden vier Versuchsreihen (A bis D) durchgeführt, die sich in den Anfangsinokula unterschieden. Angestrebt wurde für jede Versuchsreihe ein Anfangsinokulum von ca. 10^5 KBE/ml oder höher.

Aus jedem Röhrchen wurden nach 0, 2, 4, 8, 12, 24 und 36 Stunden zwei Proben von jeweils 0,1 ml entnommen und auf Skirrow-Agar im Platten-Spatel-Verfahren aufgetragen. Der 0-Wert wurde unmittelbar nach dem Inokulieren bestimmt. Unmittelbar vor Entnahme des Probenvolumens wurde in allen Milchröhrchen der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen.

Nach 48 Stunden mikroaerophiler Bebrütung bei 42 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Die Identifizierung des Keimes erfolgte mit Hilfe eines Grampräparates.

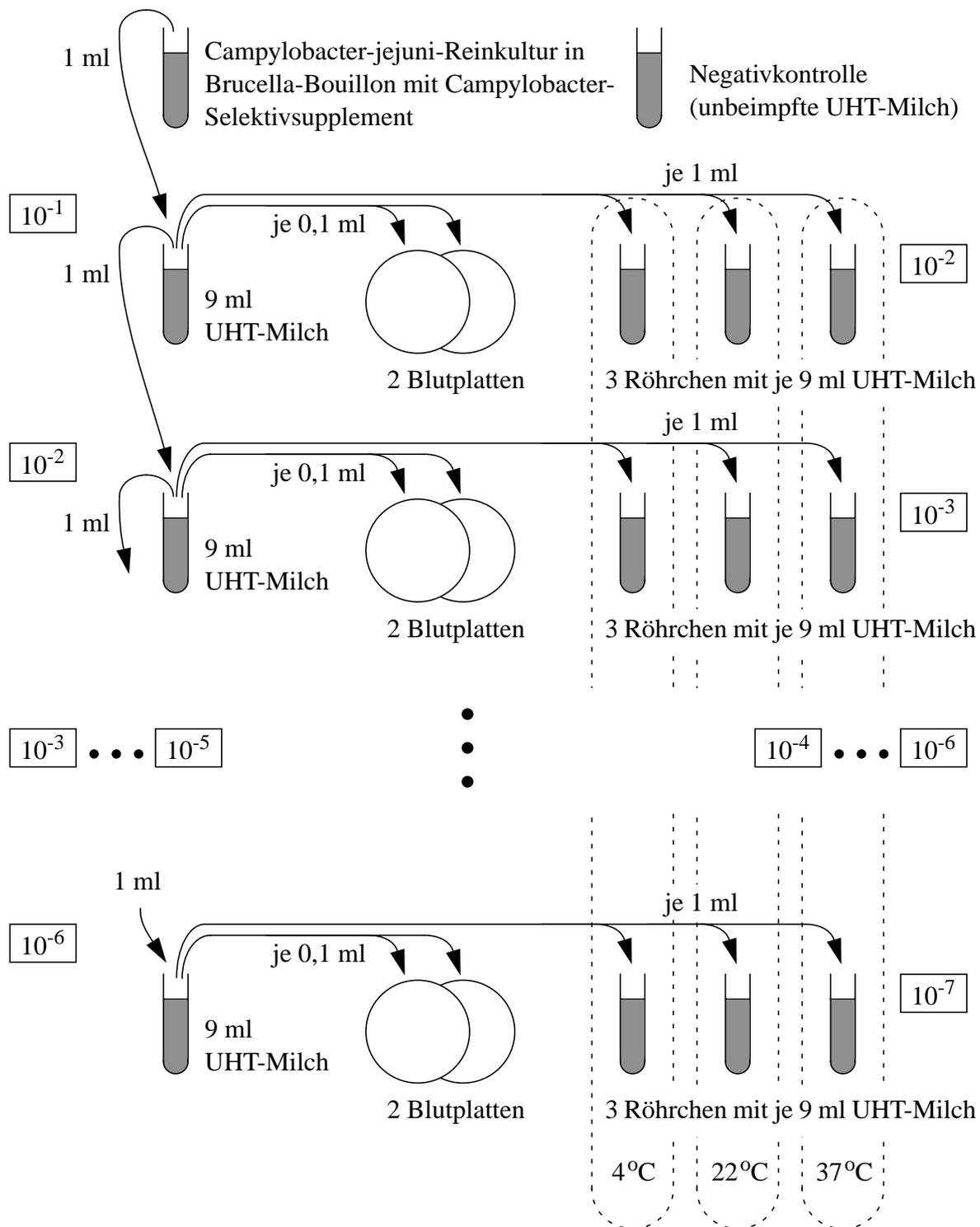


Abb. 12 Versuchsaufbau

5.2.2 Auswertung

Eine statistische Auswertung erschien aufgrund der geringen Anzahl von Versuchsreihen und der unterschiedlich hohen Anfangsinokula nicht sinnvoll.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Reisolierungsrate

Die Logarithmen der reisolierten Keimzahlen sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen für die einzelnen Versuchsreihen dargestellt.

Tabelle 51 Logarithmen der reisolierten Keimzahlen bei einer Lagerungstemperatur von 4°C

Versuchsreihe	Dauer der Lagerung						
	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	36 h
A	8,35	8,27	8,01	7,80	7,58	7,57	7,50
B	7,57	7,49	7,49	7,37	7,28	7,20	6,81
C	5,83	5,79	5,77	5,60	5,60	5,61	5,59
D	4,83	4,80	4,75	4,67	4,57	4,54	4,55

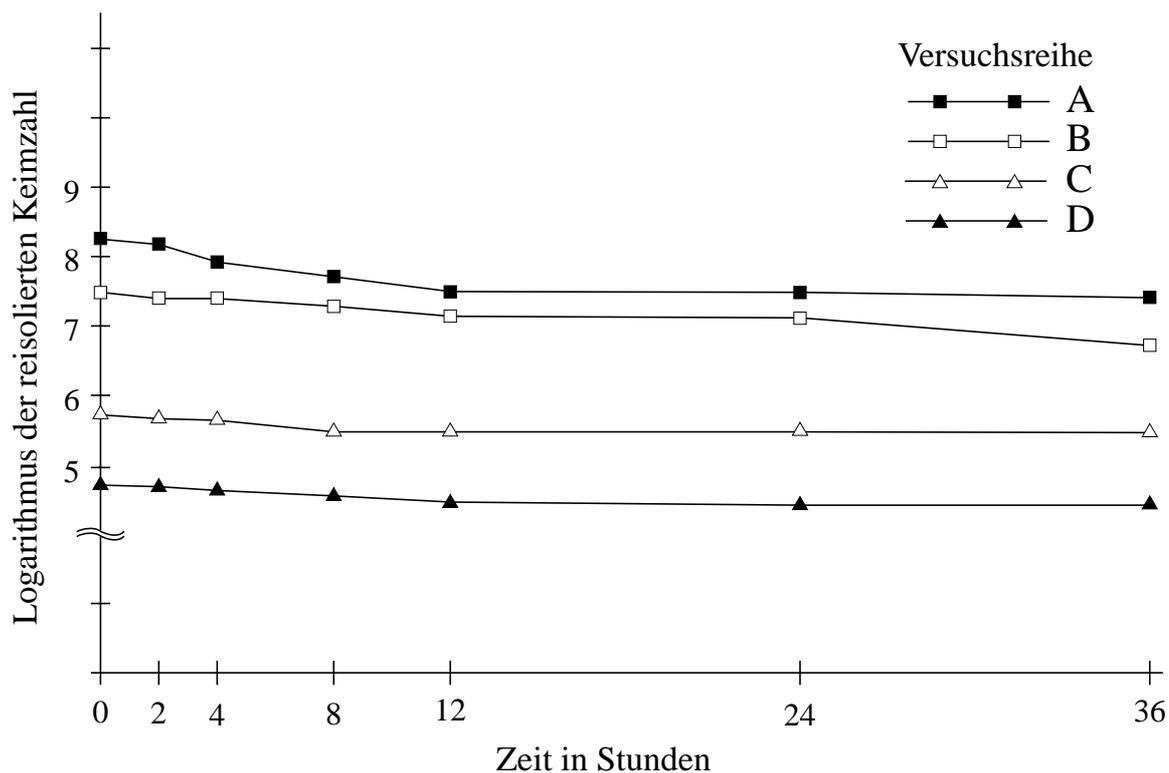


Abb. 13 Reisolierungsrate bei einer Lagerungstemperatur von 4°C (Halblogarithmische Darstellung)

Tabelle 52 Logarithmen der reisolierten Keimzahlen bei einer Lagerungstemperatur von 22°C

Versuchsreihe	Dauer der Lagerung						
	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	36 h
A	8,22	8,16	7,88	7,75	7,71	7,57	6,91
B	7,43	7,78	6,59	7,33	7,18	7,17	6,95
C	5,65	5,63	5,62	5,57	5,43	4,44	-
D	4,56	4,53	4,51	4,30	3,56	3,48	3,43

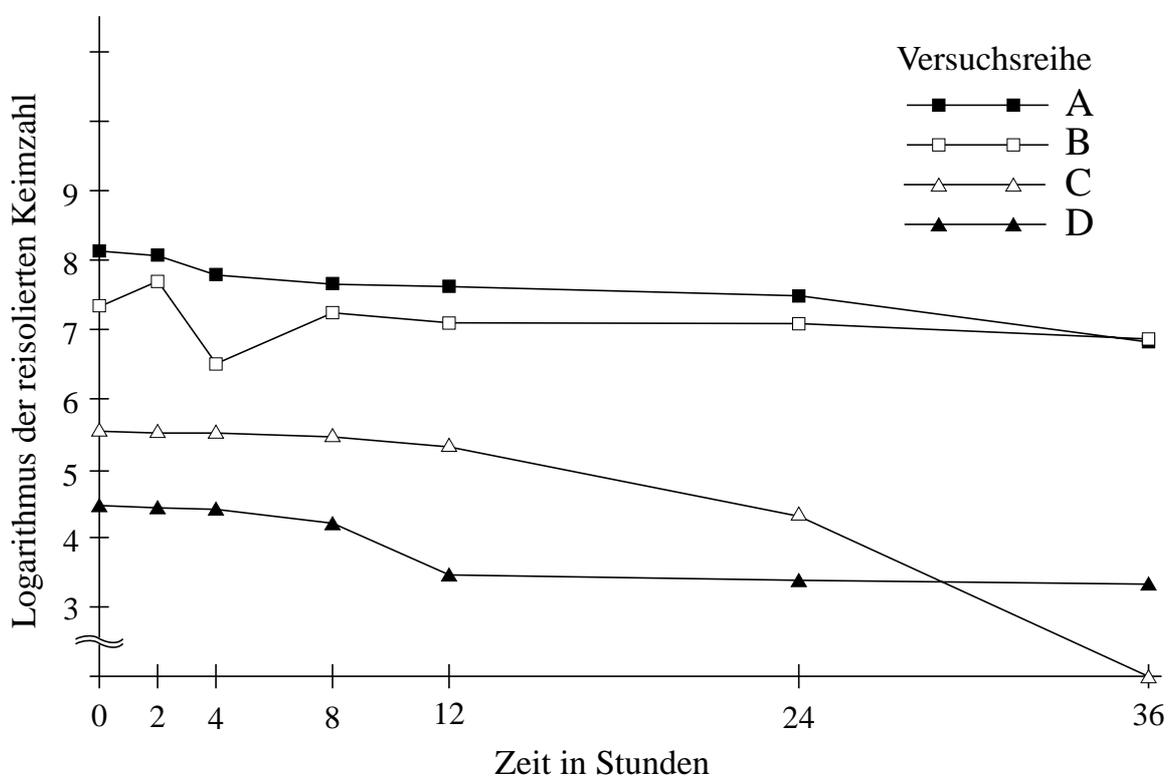


Abb. 14 Reisolierungsrate bei einer Lagerungstemperatur von 22°C (Halblogarithmische Darstellung)

Tabelle 53 Logarithmen der reisolierten Keimzahlen bei einer Lagerungstemperatur von 37°C

Versuchsreihe	Dauer der Lagerung						
	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	36 h
A	8,37	8,29	8,00	7,74	8,42	9,58	9,57
B	7,79	7,54	7,21	7,70	7,81	8,04	7,49
C	6,34	6,08	5,97	5,89	5,78	5,72	5,60
D	5,28	4,96	4,92	4,79	4,76	4,49	4,46

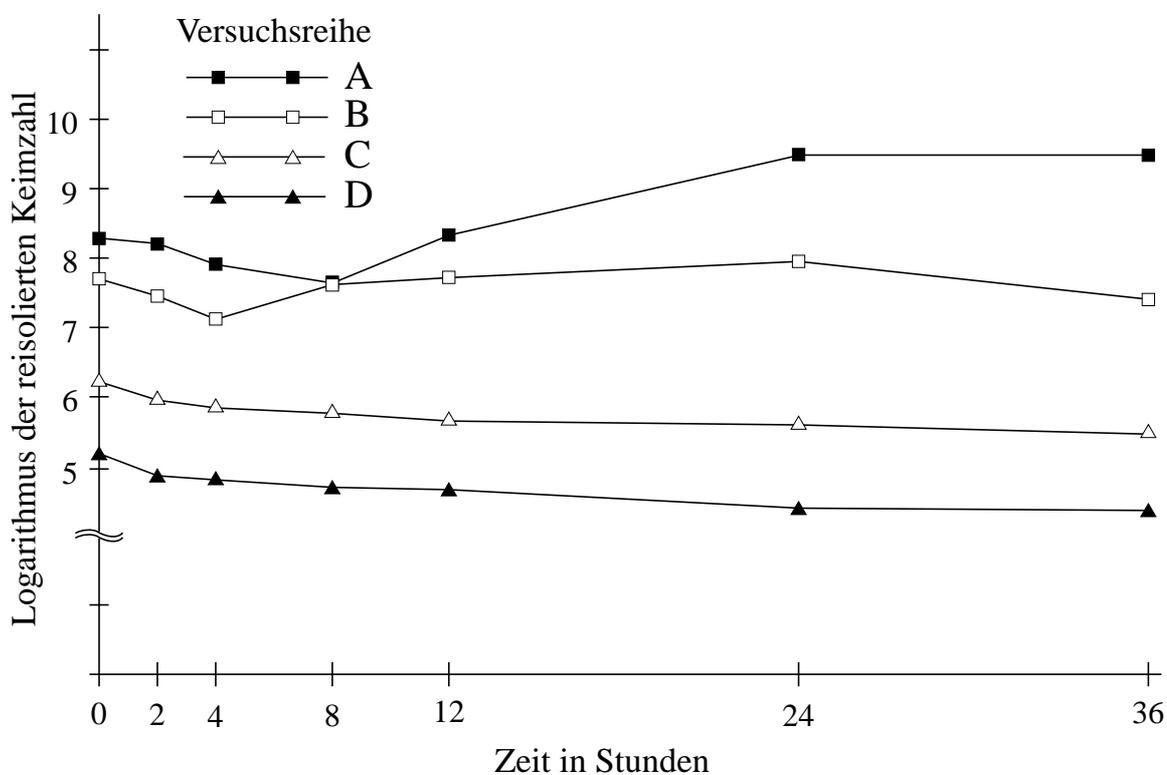


Abb. 15 Reisolierungsrate bei einer Lagerungstemperatur von 37°C (Halblogarithmische Darstellung)

5.3.2 Bestimmung des pH-Wertes

In allen Versuchsreihen blieb der pH-Wert nahezu unverändert. Tabelle 54 beschreibt den pH-Wert-Verlauf über einen Lagerungszeitraum von 36 Stunden.

Tabelle 54 pH-Wert der Milch in den einzelnen Versuchsreihen

Versuchsreihe	pH-Wert bei ...		
	4 °C	22 °C	37 °C
A	6,68 - 6,71	6,65 - 6,75	6,66 - 6,76
B	6,71 - 6,77	6,71 - 6,76	6,70 - 6,80
C	6,55 - 6,65	6,55 - 6,63	6,55 - 6,63
D	6,48 - 6,69	6,50 - 6,59	6,50 - 6,58

Der pH-Wert lag immer im Bereich des pH-Optimums für das Wachstum von *Campylobacter jejuni*.

Der pH-Wert der unbeimpften Milch lag bei Zimmertemperatur im Bereich von 6,45 bis 6,65. Der pH-Wert der verwendeten Brucella-Bouillon lag im Bereich von 6,88 bis 7,11.

In der unbeimpften Milch konnten keine Erreger festgestellt werden.