

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Tierhygiene

Nachweis und Differenzierung von
Campylobacter jejuni, *C. coli* und *C. lari* in Lebensmitteln
mittels Quadruplex real-time PCR

Anja Maria Mayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. J. Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Die Dissertation wurde am 24.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.03.2009 angenommen.

A. EINLEITUNG	1
B. LITERATUR	2
1. Taxonomie und Eigenschaften von <i>Campylobacter</i> spp.	2
2. Thermophile <i>Campylobacter</i> Spezies	6
2.1. Charakteristische Eigenschaften	6
2.2. Epidemiologie von <i>Campylobacter</i> -Infektionen	7
2.2.1. Vorkommen	7
2.2.2. Infektionsquellen und Übertragungswege	10
2.2.3. Saisonalität	13
2.3. <i>Campylobacter</i> -Infektionen als lebensmittelassoziierte Erkrankung	14
2.4. Humanpathogene Bedeutung und Prophylaxe der <i>Campylobacter</i> iose.....	16
3. Nachweis, Identifizierung und Charakterisierung thermophiler <i>Campylobacter</i> spp.	19
3.1. Kulturelle Nachweismethoden	19
3.1.1. Isolierung und Kultivierung	19
3.1.2. Bestätigung.....	21
3.2. Immunologische Typisierungs- und Nachweisverfahren	22
3.3. Molekularbiologische Verfahren	24
3.3.1. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.3.2. Methoden zur Genotypisierung.....	32
C. MATERIAL UND METHODEN	36
1. Material	36
1.1. Untersuchungsmaterial.....	36
1.1.1. Referenzstämme	36
1.1.2. Referenz-DNA	37
1.1.3. Probenmaterial	40
1.2. Nährmedien	41
1.3. Gebrauchslösungen.....	42
1.4. Gebrauchsmaterial	42
1.5. Verbrauchsmaterial.....	43
2. Methoden	44
2.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden	44
2.1.1. Anzucht und Lagerung von Referenzstämmen von <i>Campylobacter</i> spp.....	44
2.1.2. Bestimmung des Keimgehaltes einer Bakteriensuspension.....	45
2.1.3. Bestimmung der Hintergrundflora in Lebensmitteln.....	46
2.1.4. Artifizielle Kontamination von Probenmaterial	47
2.1.5. Kulturelle Voranreicherung von Lebensmitteln zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp.....	47
2.1.6. Keimisolierung und konventionelle Bestätigungsverfahren bei <i>Campylobacter</i> -positiven Lebensmittelproben.....	48
2.2. Extraktion von DNA aus Bakterienisolaten und Lebensmittelanreicherungen zum Nachweis mittels PCR	48
2.2.1. Proben für die Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR und der 16S rDNA PCR.....	49
2.2.2. Proben für die Untersuchung mit dem BAX [®] System (DuPont).....	49
2.3. Nachweis der 16S rDNA von Bakterien mittels konventioneller PCR.....	50
2.4. Sequenzierung von DNA	51
2.5. Entwicklung eines spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für <i>C. lari</i>	53

2.5.1. Sequenzierung eines Abschnittes des Gyrase-Gens (<i>gyrA</i>) von ausgewählten Stämmen von <i>C. lari</i>	53
2.5.2. Primer- und Sondendesign für ein spezifisches real-time PCR-Nachweissystem für <i>C. lari</i>	55
2.6. Quadruplex real-time PCR zum Nachweis von <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i>	56
2.6.1. Prinzip.....	56
2.6.2. Primer und Sonden.....	57
2.6.3. PCR-Bedingungen.....	58
2.7. Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR.....	60
2.7.1. Selektivität.....	60
2.7.2. Nachweisgrenze.....	61
2.7.2.1. Verdünnungsreihen von DNA.....	61
2.7.2.2. Verdünnungsreihen von Reinkulturen.....	61
2.7.2.3. Artifiziiell kontaminierte Lebensmittelproben.....	61
2.7.2.4. Test der <i>Campylobacter</i> -spezifischen Nachweissysteme im Duplex-Ansatz mit dem internen Amplifikationskontrollsystem.....	62
2.7.2.5. Untersuchung von Gemischen aus DNA aller drei <i>Campylobacter</i> Spezies.....	64
2.7.3. Effizienz und linearer Zusammenhang.....	64
2.7.4. Präzision.....	65
2.7.5. Robustheit.....	65
2.7.6. Untersuchung von Lebensmittelproben.....	65
2.8. Vergleich der Leistungsfähigkeit der Quadruplex real-time PCR mit der kulturellen Referenzmethode.....	67
2.9. Untersuchung von Isolaten aus Lebensmitteln.....	68
2.10. Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp.....	69
2.10.1. Nachweissystem nach Josefsen <i>et al.</i> (2004) basierend auf der 16S rDNA.....	69
2.10.2. BAX [®] System (DuPont Qualicon).....	71
D. ERGEBNISSE.....	73
1. Entwicklung eines spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für <i>C. lari</i>.....	73
1.1. Wahl des Gens für die Gyrase Untereinheit A (<i>gyrA</i>) von <i>Campylobacter</i> spp.	73
1.2. Sequenzierung eines Abschnittes des <i>gyrA</i> -Gens von ausgewählten Stämmen von <i>C. lari</i>	73
1.3. Primer- und Sondendesign für ein spezifisches real-time PCR-Nachweissystem für <i>C. lari</i>	75
2. Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR.....	77
2.1. Selektivität.....	77
2.2. Nachweisgrenze.....	80
2.2.1. Verdünnungsreihen von DNA.....	80
2.2.2. Verdünnungsreihen von Reinkulturen.....	83
2.2.3. Artifiziiell kontaminierte Lebensmittelproben.....	86
2.2.3.1. Nachweis von <i>C. jejuni</i> DSMZ 4688 in artifiziiell kontaminiertem Hackfleisch.....	86
2.2.3.1.1. Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe.....	86
2.2.3.1.2. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung.....	88
2.2.3.1.3. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Voranreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Voranreicherung.....	89
2.2.3.2. Nachweis von <i>C. coli</i> DSMZ 4689 in artifiziiell kontaminiertem Hackfleisch.....	91
2.2.3.2.1. Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe.....	91

2.2.3.2.2.	Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Vor-anreicherung	92
2.2.3.2.3.	Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Vor-anreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Vor-anreicherung.....	94
2.2.3.3.	Nachweis von <i>C. lari</i> CCUG 23947 in artifiziiell kontaminiertem Seelachsfilet	95
2.2.3.3.1.	Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe	95
2.2.3.3.2.	Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Vor-anreicherung	96
2.2.3.3.3.	Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Vor-anreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Vor-anreicherung.....	97
2.2.4.	Vergleich: Sensitivität von Quadruplex-Ansatz und Duplex-Ansatz	99
2.2.5.	Vergleich: Amplifizierung der DNA von nur einer <i>Campylobacter</i> Spezies und gleichzeitige Amplifizierung der DNA aller drei <i>Campylobacter</i> Spezies ...	102
2.3.	Effizienz und linearer Zusammenhang	103
2.4.	Präzision	105
2.5.	Robustheit	106
2.6.	Untersuchung von Lebensmittelproben	108
2.6.1.	Untersuchung von Lebensmittelproben nach 48 Stunden Vor-anreicherung mittels konventioneller Diagnostik und Quadruplex real-time PCR	108
2.6.1.1.	Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp. mittels konventioneller Diagnostik	108
2.6.1.2.	Nachweis von <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i> mittels Quadruplex real-time PCR	109
2.6.2.	Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden Vor-anreicherung mittels Quadruplex real-time PCR	112
2.6.3.	Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden	113
2.6.3.1.	Konventionelle Diagnostik und Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Vor-anreicherung	113
2.6.3.2.	Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Vor-anreicherung gegenüber konventioneller Diagnostik und Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Vor-anreicherung	116
3.	Untersuchung von Isolaten aus Lebensmitteln.....	117
3.1.	Identifizierung von <i>Campylobacter</i> spp. mittels konventioneller Diagnostik	117
3.2.	Identifizierung von <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i> mittels Quadruplex real-time PCR	118
3.3.	Gegenüberstellung der Ergebnisse der Identifizierung der Lebensmittelisolate mittels konventioneller Diagnostik sowie Quadruplex real-time PCR.....	119
3.4.	Sequenzierung von Isolaten von <i>Campylobacter</i> spp. zur Bestätigung der Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR	120
4.	Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp.	123
4.1.	Nachweissystem nach Josefsen <i>et al.</i> (2004) basierend auf der 16S rDNA	123
4.1.1.	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 48 Stunden Vor-anreicherung.....	123
4.1.2.	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden Vor-anreicherung	124
4.2.	BAX [®] System (DuPont Qualicon)	125
4.2.1.	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben.....	125
4.2.2.	Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Isolaten aus Lebensmitteln	126

E.	DISKUSSION	127
1.	Multiplex real-time PCR zum gleichzeitigen Nachweis und zur Differenzierung von <i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i>.....	127
2.	Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR.....	129
3.	Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit der konventionellen Diagnostik ...	135
4.	Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR-Methoden zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> spp.	139
5.	Kontamination von Lebensmitteln mit <i>Campylobacter</i> spp.....	141
F.	ZUSAMMENFASSUNG	145
G.	SUMMARY	147
H.	LITERATURVERZEICHNIS	149
I.	ANHANG.....	166

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATCC	American Type Culture Collection
BBQ	Blackberry Quencher
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	base pair
bv.	Biovar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
ca.	circa
CAT	<i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement
<i>C. c.</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. j.</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. l.</i>	<i>Campylobacter lari</i>
CCUG	Culture Collection University of Göteborg
CDT	Cytolethal-Distending Toxin
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
Ct	Threshold Cycle
CY5	Cyanin 5
DABSYL	Dimethylaminoazosulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	et alteri
EU	Europäische Union
f	femto (10 ⁻¹⁵)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
<i>g</i>	Ortsfaktor / Erdbeschleunigung (= 9,81 m/s ²)
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GSP	Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar
G	Guanin
GC	Mol% Guanin und Cytosin
h	Stunde
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IAC	Internal Amplification Control
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IMS	Immunomagnetische Separation
IPC	Interne PCR-Kontrolle
ISO	International Organization for Standardization
κ	Konkordanzindex nach Kappa
KbE	Koloniebildende Einheit
l	Liter
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LNA	Locked Nucleic Acid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³); Meter
M	Molar
mCCDA	modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar
MGB	Minor Groove Binder
Mg ₂ Cl	Magnesiumchlorid
min	Minute
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRS	Lactobacillus Agar
n	nano (10 ⁻⁹); Anzahl
N ₂	Stickstoff
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRZ	Nationales Referenzzentrum
O ₂	Sauerstoff
p	piko (10 ⁻¹²)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RAPD	Rapid Amplification of polymorphic DNA
rDNA	Ribosomale Deoxyribonucleic Acid
REC	Rapid <i>E. coli</i> Agar
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rRNA	Ribosomale Ribonucleic Acid
sec	Sekunde
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TLLV	Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
U	Uracil
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UPTC	Urease-positive thermophile <i>Campylobacter</i> spp.
V	Volt
v.a.	vor allem
VBNC	Viable but non-culturable
VRBD	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glukose-Agar
WHO	World Health Organization
YGC	Hefextrakt-Glukose-Chloramphenicol-Agar
z.B.	zum Beispiel

A. Einleitung

Die Campylobacteriose ist eine weltweit verbreitete Zoonose und die häufigste bakteriell bedingte, lebensmittelassoziierte Durchfallerkrankung. Auch in Deutschland gewann die *Campylobacter*-Enteritis in den letzten Jahren an Bedeutung. Laut statistischen Angaben des Robert Koch-Instituts lag die Zahl der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen 2005 erstmals über der Zahl der Salmonellosen (Anonymus, 2006). Auch 2007 konnte dieser Trend verzeichnet werden (Anonymus, 2008).

Als Infektionsquellen werden in erster Linie kontaminierte Lebensmittel angesehen. Die bedeutendste Rolle spielt nicht ausreichend gegartes Geflügelfleisch. Auch Lebensmittel, die aufgrund mangelnder Küchenhygiene rekontaminiert wurden, stellen ein Infektionsrisiko dar. Der Konsum von Rohmilch oder unbehandeltem Trinkwasser kann ebenso die Ursache einer Campylobacteriose sein. Als verursachende Spezies wird hauptsächlich *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* ssp. *jejuni* identifiziert. Andere thermophile Spezies wie *C. coli* und vereinzelt auch *C. jejuni* ssp. *doylei*, *C. lari* und *C. upsaliensis* werden seltener als Verursacher einer *Campylobacter*-Infektion nachgewiesen.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von thermophilen *Campylobacter* spp. als Enteritis-erreger sind zuverlässige und schnelle Nachweisverfahren dieser Mikroorganismen in Lebensmitteln unerlässlich. Für den kulturellen Nachweis wurde mit der ISO 10272:2006 ein internationales Verfahren standardisiert (Anonymus, 2006a). Dieser Nachweis ist allerdings sehr zeitaufwändig und nimmt bis zu acht Tage in Anspruch. Es wurde eine Vielzahl weniger zeitaufwändiger immunologischer oder molekularbiologischer Nachweisverfahren entwickelt. Insbesondere molekularbiologische Verfahren wie die real-time PCR gewinnen mehr und mehr an Bedeutung. In der Literatur wurde eine Reihe von real-time PCR-Methoden zum spezifischen Nachweis einer oder mehrerer thermophiler *Campylobacter* Spezies veröffentlicht. Allerdings existierten bislang keine Nachweismethoden, die die wichtigsten lebensmittelrelevanten Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* gleichzeitig erfassen und unterscheiden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein für den Einsatz in der Routinediagnostik taugliches real-time PCR-Verfahren zum parallelen Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* zu entwickeln. Das spezifische Nachweissystem wurde zunächst hinsichtlich seiner Selektivität, Sensitivität, Effizienz, Präzision und Robustheit überprüft und schließlich im Vergleich zur konventionellen Diagnostik (kultureller Nachweis) anhand von Feldproben validiert. Es wurde auch ein Vergleich mit zwei weiteren real-time PCR-Methoden zum Nachweis der drei *Campylobacter* Spezies durchgeführt.

B. Literatur

1. Taxonomie und Eigenschaften von *Campylobacter* spp.

Die Bezeichnung *Campylobacter* leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet gebogene (= campylo) Stäbchen (= bacter). Der Begriff für diese Bakteriengattung wurde erst 1963 durch Sebald und Véron geprägt (Sebald *et al.*, 1963), während von Theodor Escherich bereits 1884 spiralförmige Bakterien im Darm von Choleraerkrankten (Escherich, 1884) und 1886 bei durchfallerkrankten Säuglingen beobachtet und beschrieben wurden (Escherich, 1886). Nach heutiger Kenntnis handelte es sich dabei um *Campylobacter jejuni* oder *coli* (Kist, 2006). Es existiert eine Reihe weiterer, früherer Mitteilungen über das Auftreten von *Campylobacter* spp. bei Durchfallerkrankungen, das vor allem im Zusammenhang mit Cholerainfektionen beschrieben wurde. Allerdings blieben diese Beschreibungen lange Zeit in der Literatur unberücksichtigt (Kist, 1986). Als Erstbeobachtung des Erregers beim Menschen gilt die Beschreibung durch Levy 1946, während *Campylobacter* spp. zuvor nur in der Veterinärmedizin Aufmerksamkeit erregt hatten (Kist, 1986). Erste Berichte stammen von McFadyean und Stockman (1909), die vibrioähnliche Erreger beim seuchenhaften Verwerfen von Schafen beobachteten und von Smith und Taylor (1919), die derartige Keime in abortierten Rinderföten nachweisen konnten und sie als *Vibrio fetus* bezeichneten. Elisabeth King erkannte 1957 die Bedeutung von *Campylobacter* spp. als humane Durchfallerreger und stellte fest, dass es sich dabei um eine andere Gruppe der Vibrionen handeln musste, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie sich bei 42°C vermehrt (King, 1957). Schließlich gelang es den Mikrobiologen Butzler und Skirrow in den 1970er Jahren *Campylobacter* spp. aus menschlichem Darmmaterial zu isolieren, insbesondere aufgrund des Einsatzes antibiotikahaltiger Selektivnährmedien (Butzler *et al.*, 1973; Skirrow, 1977). Erst damit gewannen *Campylobacter* spp. ihre Bedeutung als bakterielle Diarrhoeerreger in der Humanmedizin (McClure *et al.*, 2002; Kist, 2006).

Die gebogenen oder spiralförmigen, sich charakteristisch korkenzieherartig bewegenden Stäbchen der Gattung *Campylobacter* zählen zusammen mit den Gattungen *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* und *Thiovulum* zur Familie der *Campylobacteriaceae* (Vandamme *et al.*, 2005). Innerhalb der Ordnung der *Campylobacteriales* befindet sich auch die nah verwandte Familie der *Helicobacteraceae*. Die Ordnung der *Campylobacteriales* zählt taxonomisch zur Klasse der *Epsilonproteobacteria* (Garrity *et al.*, 2005).

Die Gattung *Campylobacter* (C.) lässt sich nach derzeitigem Stand in folgende 21 Spezies und 8 Subspezies bzw. Biovarietäten einteilen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=194>):

- *C. canadensis*
- *C. coli*
- *C. concisus*
- *C. curvus*
- *C. faecalis*
- *C. fetus*
 - *C. fetus* ssp. *fetus*
 - *C. fetus* ssp. *venerealis*
- *C. gracilis*
- *C. helveticus*
- *C. hominis*
- *C. hyointestinalis*
 - *C. hyointestinalis* ssp. *hyointestinalis*
 - *C. hyointestinalis* ssp. *lawsonii*
- *C. insulaenigrae*
- *C. jejuni*
 - *C. jejuni* ssp. *jejuni*
 - *C. jejuni* ssp. *doylei*
- *C. lanienae*
- *C. lari*
- *C. lawrenceae*
- *C. mucosalis*
- *C. peloridis*
- *C. rectus*
- *C. showae*
- *C. sputorum*
 - *C. sputorum* biovar *sputorum*
 - *C. sputorum* ssp. *bubulus*
- *C. upsaliensis*

Diese aktuelle taxonomische Einteilung unterscheidet sich zum Teil von der Einteilung, die in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005) vorgenommen wurde. Die Problematik bei der Taxonomie der Gattung *Campylobacter* besteht darin, dass sie in erster Linie phylogenetisch begründet ist und dadurch Spezies vereint werden, die sehr unterschiedliche zelluläre Morphologien und Basenverhältnisse der DNA aufweisen (Vandamme *et al.*, 2005). Es treten taxonomische Probleme auf Speziesebene und zwischen den Spezies auf. Beispielsweise konnte anhand von DNA-DNA Hybridisierung und 16S rRNA Sequenzierung gezeigt werden, dass *C. sputorum* ssp. *mucosalis* eine eigene Spezies darstellt (*C. mucosalis*). In Bergey's Manual wurden die Subspezies *sputorum* und *bubulus* zu einem Biovar der Spezies *C. sputorum* (*C. sputorum* bv. *sputorum*) zusammengefasst und die Spezies *C. faecalis* wurde ebenso als eine Biovarietät von *C. sputorum* identifiziert (Vandamme *et al.*, 2005). Insbesondere bei den thermophilen Arten von *Campylobacter* bestehen Unklarheiten bezüglich ihrer Spezieszuordnung. Bei der Gruppe der Nalidixinsäure-sensitiven und Urease-positiven thermophilen *Campylobacter* spp. (UPTC) konnte erst durch quantitative DNA-DNA Hybridisierung dargestellt werden, dass es sich dabei um Varianten von *C. lari* handelt. Endtz *et al.* (1997) beschreiben eine hohe genetische Diversität innerhalb der

verschiedenen Varianten von *C. lari*. Auch die Trennung von *C. jejuni* ssp. *jejuni* und *C. coli* ist aufgrund großer phäno- und genotypischer Ähnlichkeit problematisch. Der Unterschied ist nur anhand der Hippurathydrolyse von *C. jejuni* und wenigen anderen biochemischen Reaktionen deutlich zu machen (Vandamme *et al.*, 2005). Für die Spezies *C. hyoilei* konnte aufgrund gleicher phänotypischer Merkmale sowie durch DNA-DNA Hybridisierung und Spezies-spezifische PCR-Nachweissysteme gezeigt werden, dass es sich dabei auch um *C. coli* handelt (Vandamme *et al.*, 1997), obwohl die 16S rRNA Gensequenz eine höhere Ähnlichkeit zu *C. jejuni* aufweist (Alderton *et al.*, 1995).

Diese Beispiele machen deutlich, dass es noch besserer phäno- und genotypischer Kriterien bedarf, um eine eindeutige Klassifizierung dieser Bakteriengattung zu ermöglichen (Vandamme *et al.*, 2005).

Campylobacter spp. haben einen Durchmesser von ca. 0,2-0,8 µm und sind ca. 0,5-5 µm lang. Sie sind mikroaerophil und kapnophil. Eine Atmosphäre mit 3-15% O₂, 3-10% CO₂ und 85% N₂ ist für ihr Wachstum optimal (Mansfield *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002). Bis auf die thermophilen Spezies haben *Campylobacter* spp. ihr Wachstumsoptimum bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C. Sie bilden keine Sporen. Als Energiequelle verwenden sie Aminosäuren und Intermediärprodukte des Citratzyklus und können Kohlenhydrate weder vergären noch oxidieren. Typische biochemische Reaktionen sind die Reduktion von Fumerat zu Succinat sowie die Reduktion von Nitrat. Bis auf *C. gracilis* sind *Campylobacter* spp. Cytochromoxidase-positiv (Kist, 2006) und in der Regel Katalase-positiv sowie Urease-negativ (Van Vliet und Ketley, 2001). Sie haben an einem oder an beiden Enden eine Geißel, mit Hilfe derer sie typische schnelle, korkenzieherartige Bewegungen ausführen können. Ausnahmen bilden die nicht begeißelte Spezies *C. gracilis* und die mehrfach begeißelte Spezies *C. showae* (Vandamme, 2000). *Campylobacter* spp. sind langsam wachsende Organismen mit einer Generationszeit von etwa 90 Minuten. Es handelt sich hierbei um sehr anspruchsvolle Bakterien, die schwer kultivierbar sind und auf Umwelteinflüsse wie niedrigen pH-Wert (< 5), Trockenheit, Salzkonzentrationen über 2% oder Temperaturen zwischen 10 und 30°C empfindlich reagieren. Sie sind jedoch gegenüber einer Reihe von Antibiotika wie z.B. Vancomycin, Polymyxin B, Trimethoprim, Cephalosporine, Makrolide (Erythromycin, Amphotericin B) und Fluorochinolone (Ciprofloxacin) resistent, was für die Zusammensetzung von Selektivmedien von Bedeutung ist (Mansfield *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002; Donnison, 2003; Vandamme, 2005).

Bei ungünstigen Umweltbedingungen können sich *Campylobacter* spp. in kokkoide Degenerationsformen verwandeln. In diesem Stadium sind sie lebensfähig, jedoch nicht kultivierbar. Dieser Zustand wird als "viable but non-culturable" (VBNC) bezeichnet (McClure *et al.*, 2002). Hinsichtlich der Infektiosität und der Fähigkeit von Zellen in diesem Zustand, den Darm von Tieren zu kolonisieren, bestehen kontroverse Ansichten. Rollins und Colwell

(1986), die die VBNC-Form bei *C. jejuni* erstmals beschrieben, gehen davon aus, dass es durch eine Darmpassage zur Rückwandlung in die Spiralform kommt. Eine Wiederbelebung von VBNC-Zellen in Labortieren wurde auch von anderen Autoren belegt (Murphy *et al.*, 2006). Andere zeigten jedoch auf, dass VBNC-Zellen nach oraler Aufnahme nicht im Kot oder im Zäkum von Küken (Medema *et al.*, 1992; Ziprin *et al.*, 2003; Ziprin und Harvey, 2004) oder in menschlichen Stuhlproben (Beumer *et al.*, 1992) nachweisbar sind. Hazeleger *et al.* (2005) konnten bei Ratten, Hasen und Menschen auch keine *Campylobacter*-Antikörper als Reaktion auf VBNC-Zellen detektieren. Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Beobachtungen könnte sein, dass die Fähigkeit zur Darmkolonisierung von Zellen im VBNC-Zustand letztendlich vom jeweiligen Stamm abhängt (Murphy *et al.*, 2006). Unabhängig davon spielt die VBNC-Form jedoch eine wichtige Rolle beim Überleben von *Campylobacter* spp. in der Umwelt. Studien haben gezeigt, dass „lebende“ Zellen bei 4°C bis zu sieben Monate detektierbar sind (Lazaro *et al.*, 1999).

Der Großteil der *Campylobacter* Spezies ist Teil der normalen Intestinalflora von vielen Wild- und Haustieren. Als Reservoir für *C. jejuni* ssp. *jejuni* und *C. coli* dienen Geflügel, Rinder, Schweine, Schafe und andere Säugetiere (Kist, 2006; Humphrey *et al.*, 2007). *C. lari* kommt bei Geflügel, Möwen, Hunden, Katzen, Affen und Pferden vor. Diese *Campylobacter* Spezies sind für den Menschen pathogen und verursachen Gastroenteritiden und Septikämien (Simor und Wilcox, 1987; Stein, 2004). Auch die Spezies *C. upsaliensis* und *C. helveticus*, die bei Hunden und Katzen nachgewiesen wurden, sowie die Spezies *C. hyointestinales* ssp. *hyointestinales*, die aus Schweinen isoliert wurde, können beim Menschen Darm-erkrankungen hervorrufen (Bourke *et al.*, 1998; Kist, 2006). Für *C. jejuni* ssp. *doylei* wird der Mensch selbst als natürliches Reservoir angesehen, wobei diese Spezies vor allem bei Kindern Enteritis und Bakteriämie hervorrufen kann. Weitere Spezies, die beim Menschen in der Regel in der Mundhöhle vorkommen sind *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae* und *C. sputorum* bv. *sputorum*. Sie werden in Zusammenhang mit Erkrankungen des Zahnfleisches gesehen, bei *C. concisus*, *C. curvus* und *C. sputorum* bv. *sputorum* sind auch Fälle von Gastroenteritis beschrieben (Kist, 2006; Humphrey *et al.*, 2007). Von veterinärpathogener Bedeutung sind vor allem die Spezies *C. fetus* und *C. hyointestinales* (Vandamme *et al.*, 2002). *C. fetus* ssp. *fetus* führt zu Aborten bei Rindern und Schafen, während *C. fetus* ssp. *venerealis* im Genitaltrakt von Rindern Reproduktionsprobleme hervorrufen kann. *C. hyointestinales* ist Verursacher von Darmerkrankungen bei Schweinen (Vandamme *et al.*, 2005; Humphrey *et al.*, 2007). Die Spezies *C. fetus* kann auch beim Menschen Sepsis verursachen. Für *C. fetus* ssp. *fetus* sind auch Fälle von Gastroenteritis, Meningitis und Aborten beschrieben (Kist, 2006; Humphrey *et al.*, 2007).

Bislang sind die Mechanismen der Pathogenese der durch *Campylobacter* spp. verursachten Gastroenteritis beim Menschen noch unklar. Es wird davon ausgegangen, dass verschiedene Virulenzfaktoren zusammen wirken, die bei den einzelnen Stämmen aufgrund ihrer hohen genetischen Variabilität unterschiedlich ausgeprägt sein können. Ihre Wirkung ist auch vom Immunstatus der betroffenen Person und einer möglichen Koinfektion durch andere enteroinvasive Mikroorganismen abhängig (Mansfield *et al.*, 2000).

Als ein Virulenzfaktor wird die chemotaktisch gesteuerte **Motilität** angesehen, die die Voraussetzung für eine Kolonisierung des Darms durch die Bakterien darstellt. Das Flagellum und die Spiralform des Bakteriums sind hier von besonderer Bedeutung (Van Vliet und Ketley, 2001; Kist, 2002). Die **Adhäsion** an die intestinalen Epithelzellen wird durch Proteine der Geißel sowie durch Membranproteine (z.B. *cadF*), Lipopolysaccharide und evtl. Fimbrien-ähnliche Strukturen (Mansfield *et al.*, 2000) ermöglicht. Bei der **Invasion** in die Epithelzellen spielen verschiedene Invasionsproteine (z.B. *ciaB*, Konkel *et al.*, 1999a) und Sekretionssysteme eine Rolle, für die bislang keine kodierenden Gene eindeutig identifiziert wurden (Van Vliet und Ketley, 2001). Neben der Invasion in die Zellen wird auch die **toxische Aktivität** von *Campylobacter* spp. als Ursache für zytopathische Effekte angesehen. Es wurden eine Reihe verschiedener Toxine wie zum Beispiel ein *Vibrio cholerae* Toxin-ähnliches Enterotoxin und verschiedene Zytotoxine (z.B. Shiga-like Toxin, hämolytische Zytotoxine) beschrieben (Wassenaar, 1997). Allerdings wurde bis jetzt nur das Cytolethal-Distending Toxin (CDT) von *C. jejuni* als pathogenes Toxin auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert (Wassenaar, 1997; Kist, 2002). Die **Fähigkeit, sich an veränderte Umweltbedingungen anzupassen**, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese. Durch die Expression von Hitzeschockproteinen (z.B. *groESL*, *dnaJ*, *dnaK* und *clpB*) kann sich *C. jejuni* an die unterschiedlichen Körpertemperaturen seiner Wirtsorganismen (42°C bei Vögeln, 37°C bei Rind, Schwein und Mensch) oder die Temperaturen von Vektoren (Wasser, Lebensmittel) anpassen (Van Vliet und Ketley, 2001).

2. Thermophile *Campylobacter* Spezies

2.1. Charakteristische Eigenschaften

Die Gruppe der thermophilen *Campylobacter* Spezies, zu denen *Campylobacter* (*C.*) *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* und *C. helveticus* zählen (Vandamme, 2002), ist dadurch charakterisiert, dass ihre optimale Wachstumstemperatur bei 42°C liegt und dass sie unfähig sind, bei 25°C zu wachsen (Kist, 2006). Während sie bei Raumtemperatur rasch absterben, können sie bei 4°C einige Tage und im gefrorenen Zustand dauerhaft überleben.

Thermophile *Campylobacter* spp. sind aufgrund ihrer hohen Verbreitung bei Geflügel, Rindern, Schweinen und Schafen als Lebensmittelpathogene von Bedeutung.

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist *C. jejuni* ssp. *jejuni*. Er gilt als häufigster Erreger der *Campylobacter*-Enteritis beim Menschen (Mansfield *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002). Laut Robert Koch-Institut (RKI) wurden 2003 bei den *Campylobacter*-Erkrankungen, zu denen genauere Daten zur Spezies vorlagen (78,1%), 84,4% als *C. jejuni* und 12,2% als *C. coli* identifiziert (Anonymus, 2004). 2007 wurde bei der Auswertung der Daten eine weitere Erhöhung von Infektionen durch *C. jejuni* (89,9%) verzeichnet, während die Zahlen der durch *C. coli* (8,0%) verursachten Erkrankungsfälle eher rückläufig waren (Anonymus, 2007a). *C. lari* und *C. upsaliensis* spielen als Enteritis-Erreger nur eine untergeordnete Rolle.

Als Unterscheidungsmerkmal von den anderen thermophilen *Campylobacter* spp. gilt die positive Hippurat-Reaktion von *C. jejuni* (Donnison, 2003; Kist, 2006). *C. jejuni* umfasst die Subspezies *C. jejuni* ssp. *jejuni* und *C. jejuni* ssp. *doylei*. Die beiden Subspezies können mit Hilfe der Nitratreduktion unterschieden werden, da *C. jejuni* ssp. *jejuni* im Gegensatz zu *C. jejuni* ssp. *doylei* in der Lage ist, Nitrat zu reduzieren (Vandamme, 2000). Die beiden Subspezies unterscheiden sich außerdem in ihrer humanpathogenen Rolle. *C. jejuni* ssp. *jejuni* ist in 80-90% der *Campylobacter*-Enteritis das verursachende Bakterium (McClure *et al.*, 2002). *C. jejuni* ssp. *doylei* dagegen verursacht nur in ganz seltenen Fällen Enteritis (Kist, 2006).

C. lari unterscheidet sich in der Regel von den anderen Spezies der thermophilen *Campylobacter* durch seine Resistenz gegenüber Nalidixinsäure (Lastovica *et al.*, 2000). Es gibt jedoch auch Nalidixinsäure-sensitive Varianten von *C. lari* (Endtz *et al.*, 1997).

C. upsaliensis ist Katalase-negativ und obwohl *C. upsaliensis* zu den thermophilen Spezies zählt, wachsen nur ca. 80% der Stämme von *C. upsaliensis* bei 42°C, während die anderen 20% 37°C benötigen (Goossens *et al.*, 1990).

2.2. Epidemiologie von *Campylobacter*-Infektionen

2.2.1. Vorkommen

Wie bereits unter Punkt 1 beschrieben, kommen thermophile *Campylobacter* spp. als Teil der natürlichen Darmflora bei vielen warmblütigen Haus- und Wildtieren vor. Insbesondere bei Wildvögeln und bei Hausgeflügel (Hühner, Enten, Puten) sind sie durch Adaption an deren Körpertemperatur von 42°C stark verbreitet (Ketley, 1997). Rinder, Schweine, Schafe und andere Haustiere stellen ebenfalls natürliche Reservoirs dar (Anonymus, 2000; McClure *et al.*, 2002; Humphrey *et al.*, 2007). Während *C. jejuni* insgesamt am häufigsten nachgewiesen

wird, dominiert bei Schweinen und Pute die Spezies *C. coli* (Kist, 2006). *C. lari*, erstmals 1980 isoliert (Benjamin *et al.*, 1983), kommt überwiegend bei Möwen, Meeresfischen und Schalentieren vor (Endtz *et al.*, 1997; Teunis *et al.*, 1997; Vandamme, 2000). *C. upsaliensis* wurde sowohl aus menschlichem Stuhl als auch aus dem Kot von Hunden und Katzen isoliert (Hald und Madsen, 1997; Vandamme, 2000; Engvall *et al.* 2003).

Bei Rindern, Schafen und Schweinen wird davon ausgegangen, dass *Campylobacter* spp. durch den Kontakt der Tiere mit der Umwelt aufgenommen werden. Vor allem bei Aufnahme von Wasser aus natürlichen Quellen und bei Freilandhaltung ist mit höheren Infektionsraten zu rechnen. Von Humphrey *et al.* (2007) wurden aus Daten von 21 verschiedenen Ländern durchschnittliche Infektionsraten von 30,0% bei Milchkühen, 62,1% bei Mastrindern, 31,1% bei Schafen und 61,0% bei Schweinen berechnet. Der Keimgehalt in Fäzes von Rindern liegt im Durchschnitt bei ca. 10^3 koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Gramm. Bei so genannten „high shedders“ werden aber auch Werte von 10^6 KbE/g erreicht (Stanley und Jones, 2003). In einer dänischen Studie wies Nielsen (2002) bei Kühen im Durchschnitt 10^2 KbE pro Gramm Kot nach, während bei Kälbern unter vier Monaten die Prävalenz und die Keimkonzentrationen im Kot mit durchschnittlich 10^4 KbE pro Gramm signifikant höher waren. Die dominierende Spezies bei Rindern ist *C. jejuni* (Nielsen *et al.*, 1997). Bei Lämmern fanden Stanley und Jones (2003) im Durchschnitt 10^4 KbE pro Gramm Darminhalt. Schweine sind in erster Linie mit *C. coli* kontaminiert (Weijtens *et al.*, 1999; Van Looveren *et al.*, 2001). Weijtens *et al.* (1999) ermittelten in ihrer Untersuchung bei Mastschweinen abnehmende Kolonisationsraten von 10^4 KbE pro Gramm Fäces mit 13 Wochen und 10^2 KbE pro Gramm Fäces gegen Ende der Mastperiode (25 Wochen).

Da es keine wirksamen Maßnahmen gibt, die die Tiere in Freilandhaltung vor Infektionen mit *Campylobacter* spp. schützen würden, müssen Kontrollmaßnahmen später in der Lebensmittelkette angewendet werden. Dabei sind vor allem eine gute Melk- und Schlachthygiene und die Pasteurisation von Rohmilch von Bedeutung (Humphrey *et al.*, 2007).

Bei Geflügel sind nach den Berechnungen bei Humphrey *et al.* (2007) Hähnchen zu 58,7%, Puten zu 78,0% und Enten zu 38,0% mit *Campylobacter* spp. infiziert. Die Kolonisationsrate von *C. jejuni* im Geflügeldarmtrakt kann bei 10^6 - 10^7 koloniebildenden Einheiten pro Gramm Kot liegen (Corry *et al.*, 2001; Kiehl, 2004). Die dominierende Spezies ist *C. jejuni* (Aarestrup *et al.*, 1997; Van Looveren *et al.*, 2001). Bei Hähnchen ist eine deutliche Saisonalität des Auftretens von *Campylobacter*-Infektionen mit Höchstwerten im Sommer zu beobachten. Als Ursache wird unter anderem ein erhöhter Eintrag durch Fliegen in den Sommermonaten angesehen (Ekdahl *et al.*, 2005). Für die allgemein hohe Belastung von Geflügel mit *Campylobacter* spp. wurden insbesondere für Hähnchen verschiedene Ursachen beschrieben. Die äußere Umgebung wird als wichtigste Infektionsquelle angesehen. Eine Übertragung von *Campylobacter* spp. von anderen Haustieren wie Kühen, Schweinen, Hunden und Katzen

auf die Broilerherde ist sehr wahrscheinlich. Sie kann unter anderem durch das Personal bei nicht sachgerechter Benutzung von Desinfektionsmatten erfolgen (Kist, 2002). Auch Nagetiere, Wildvögel und Insekten sind als Überträger von *Campylobacter*-Infektionen von Bedeutung (Corry *et al.*, 2001). Ein weiteres Risiko für eine Infektion stellt kontaminiertes Wasser dar. Um diesen Übertragungsweg auszuschließen, sollte nur Wasser mit Trinkwasserqualität verwendet werden (Corry *et al.*, 2001; Humphrey *et al.*, 2007). Auch das Ausdünnen von Beständen führt zu höheren Durchseuchungsraten, da beim Entfernen schlachtreifer Broiler durch die Mitarbeiter eine Einschleppung erfolgen kann (Kist, 2002; Humphrey *et al.*, 2007). Weitere Probleme ergeben sich durch mangelhafte Reinigung und Desinfektion der Mastställe zwischen aufeinander folgenden Herden. Es kann zur Infektion der neuen Herde mit Keimen der voran gegangenen kommen (Humphrey *et al.*, 2007). Eine vertikale Übertragung wird bei *Campylobacter* spp. eher nicht angenommen, da bei Küken in der Regel erst in der dritten bis sechsten Lebenswoche eine Kolonisation nachzuweisen ist. Dennoch konnte *C. jejuni* im Eileiter von Hennen und im Samen von Hähnen nachgewiesen werden. Bei frisch geschlüpften Küken wurde bislang allerdings noch kein Nachweis erbracht (Humphrey *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Haltungform ausschlaggebend für die Kontamination von Broilerherden mit *Campylobacter* spp. ist. Bei ökologisch gehaltenen Beständen waren 100% der Herden infiziert, während Bestände aus konventioneller Käfighaltung zu 36,7% und aus extensiver Bodenhaltung zu 49,2% kontaminiert waren (Heuer *et al.*, 2001). Die Autoren führen den ungehinderten Kontakt von ökologisch gezüchteten Herden mit Wasser und Boden im Freien und das höhere Alter bei der Schlachtung als mögliche Ursachen für die höhere Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei diesen Tieren an. Auch Insekten können als Reservoir und Vektor für *Campylobacter* spp. dienen. In zwei verschiedenen Studien konnten aus 8,0 bzw. 2,4% der untersuchten Fliegen *Campylobacter* spp. isoliert werden (Ekdahl *et al.*, 2005).

Campylobacter spp. werden mit dem Kot von Tieren in die Umwelt ausgeschieden und sind damit ubiquitär und insbesondere im Wasser weit verbreitet. Wenngleich eine Vermehrung außerhalb des Wirtsorganismus nicht möglich ist, so überleben *Campylobacter* spp. in Wasser mindestens 60 Tage und in lebensfähiger, nicht-kultivierbarer Form wahrscheinlich noch länger (Talibart *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Keimzahlen in Flüssen und Seen in der kühleren Jahreszeit höher sind, da niedrigere Temperaturen und eine geringere UV-Einstrahlung das Überleben der Keime begünstigen. Besonders hohe Keimgehalte sind in Flüssen nachzuweisen, die sich in der Nähe landwirtschaftlicher Betriebe oder Weideflächen befinden bzw. dem Abfluss von Kläranlagen ausgesetzt sind (Jones, 2001). Auch die Kontamination von Grundwasser durch Ausscheidungen von Nutztieren wurde beschrieben (Stanley *et al.*, 1998). Der Eintrag von *Campylobacter* spp. in Seen erfolgt auch durch Wassergeflügel. Insbesondere bei Küstengewässern wird die Kontamina-

tion durch Vögel wie Austernfischer und Möwen verursacht. Dies konnte zum einen daran gezeigt werden, dass eine Abwasserbehandlung nicht zur Reduktion von *Campylobacter* spp. im Meerwasser führte und zum anderen daran, dass die isolierten Spezies nicht mit denen im Abwasser (*C. jejuni* und *C. coli*), sondern mit denen der Wildvögel (*C. lari* und Urease-positive thermophile *Campylobacter* spp.) übereinstimmten (Jones, 2001).

2.2.2. Infektionsquellen und Übertragungswege

Ausbrüche von *Campylobacter*-Infektionen werden eher selten beobachtet. Ihr Anteil als Ursache von Gastroenteritis-Ausbrüchen betrug in England und Wales nur 0,4%, während Salmonellen zu 8,0% und *Escherichia coli* O157 zu 15,5% als verursachendes Agens identifiziert werden konnten (Frost *et al.*, 2002). Bei einer Studie in den Niederlanden betrug der durch *Campylobacter* spp. verursachte Anteil von 281 untersuchten Ausbrüchen ein Prozent (van Duynhoven *et al.*, 2005). Ausbrüche von *Campylobacter*-Infektionen wurden vor allem im Zusammenhang mit dem Verzehr von unpasteurisierter Milch (Gillespie *et al.*, 2003) und dem Essen in Restaurants beschrieben (Frost *et al.*, 2002). In der Regel treten durch *Campylobacter* spp. verursachte Infektionen eher sporadisch auf. In verschiedenen Studien wurden die Quellen bzw. die Vektoren für eine Infektion untersucht.

Als Hauptvektoren für menschliche *Campylobacter*-Infektionen gelten nicht durchgegartes Geflügelfleisch und Rohmilch (Kist, 2006).

Von Humphrey *et al.* (2007) wurde für rohes Hähnchenfleisch eine durchschnittliche Kontaminationsrate von ca. 60% ermittelt. Die Werte unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Ländern. So wurden in England, Wales, den Niederlanden und den USA Raten zwischen 80-90% gemeldet, während in Skandinavien durchwegs geringere Prävalenzen gefunden wurden (Corry *et al.*, 2001). Für Deutschland wurden Zahlen von 33% bzw. 46% ermittelt (Kist, 2002). Die Keimbelastung pro Schlachttierkörper liegt bei englischen Hähnchen bei 10^6 (ausgenommene Tiere) bzw. bei 10^7 (nicht ausgenommene Tiere), während in den USA Zahlen von 10^4 - 10^5 pro Karkasse angegeben werden (Corry *et al.*, 2001). Auch für Puten- und Entenfleisch sind die durchschnittlichen Kontaminationsraten mit 47,8% und 30,2% sehr hoch (Humphrey *et al.*, 2007). Aufgrund der hohen Belastung von Geflügel mit *Campylobacter* spp. ist dessen Bedeutung als Infektionsquelle für menschliche Infektionen offensichtlich. In zahlreichen Studien (Neimann *et al.*, 2003; Michaud *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2004) wurden Zusammenhänge zwischen dem Konsum von rohem oder nicht durchgegartem Hähnchenfleisch und Fällen von Erkrankungen beschrieben.

Wenngleich Geflügel als Hauptquelle für menschliche Infektionen mit *Campylobacter* spp. angesehen wird, konnte durch Typisierung von Stämmen jedoch gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil der humanen Stämme nicht mit den bei Geflügel vorkommenden

Stämmen übereinstimmt (Corry *et al.*, 2001). Einige stammen aus Rindern, obwohl bei Rindfleisch generell sehr geringe Raten (2,7%, Humphrey *et al.*, 2007) nachgewiesen werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Infektion eher durch Milch oder Oberflächenwasser, das durch den Kot der Tiere verschmutzt wurde, erfolgt. Es könnte auch sein, dass Rinder und Menschen eine gemeinsame, bislang unbekannte Infektionsquelle haben (Corry *et al.*, 2001).

Der Konsum von Milch wird als Risikofaktor für humane *Campylobacter*-Infektionen angesehen. Bei einer Studie in England zwischen 1992 und 2000 betrug der Anteil von durch Milch verursachten Ausbrüchen infektiöser Darmerkrankungen 2% aller lebensmittelbedingter Ausbrüche (Gillespie *et al.*, 2003). Bei den durch Milch verursachten Ausbrüchen wurde in 52% der Fälle unpasteurisierte Milch als Ursache identifiziert. *Campylobacter* spp. wurden bei 26% der durch den Konsum von Milch verursachten Darmerkrankungen als Ursache identifiziert, während Salmonellen zu 37% und verotoxinbildende *E. coli* O157 zu 33% beteiligt waren. Studien haben gezeigt, dass vor allem Kleinkinder bei Konsum von kontaminierter Rohmilch erkranken, während ältere Personen oder gewohnheitsmäßige Rohmilchtrinker seltener erkranken (Kist, 2002). Es wird davon ausgegangen, dass Kontaminationen in der Regel fäkalen Ursprungs sind. In seltenen Fällen können sie auch durch eine Mastitis verursacht werden. Die Kontaminationsrate in Rohmilchsammelproben liegt zwischen 1,4% und 9,2% (Kist, 2002).

Rind-, Schweine- und Lammfleisch sind in der Regel trotz der hohen Zahl von *Campylobacter*-positiven Tieren nur in geringem Maße (2,7%, 2,0% und 6,0%) mit *Campylobacter* spp. kontaminiert (Humphrey *et al.*, 2007). Der Grund hierfür ist vor allem im Schlachtprozess zu sehen, bei dem durch eine gute Schlachthygiene die Kontamination der Schlachtkörper weitestgehend vermieden werden kann. Auch das Kühlen der Karkassen führt zur Reduzierung des Keimgehaltes. Dennoch ist ein Infektionsrisiko gegeben und es wurden Fälle von Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Konsum von gegrilltem oder nicht ausreichend gebratenem Fleisch berichtet (Neimann *et al.*, 2003, Carrique-Mas *et al.*, 2005). Eine Infektion mit *Campylobacter* spp. insbesondere mit *C. lari* kann durch den Verzehr roher oder nicht durchgegarter Muscheln erfolgen. Der Eintrag erfolgt in erster Linie über den Kot von Möwen, bei denen als dominierende Spezies *C. lari* isoliert wird (Teunis *et al.*, 1997). Bei der Untersuchung von 380 Schalentieren in Nordirland waren 42% mit thermophilen *Campylobacter* spp. kontaminiert (Wilson und Moore, 1996). In den Niederlanden waren bei einer Studie 41 von 59 Chargen Muscheln (69%) und 11 von 41 Chargen Austern (27%) *Campylobacter*-positiv. Die Charakterisierung der Isolate ergab bei 95% *C. lari*, wobei durch Genotypisierung eine hohe genetische Diversität zwischen den verschiedenen Stämmen aufgezeigt werden konnte (Endtz *et al.*, 1997).

Kontaminiertes oder unbehandeltes Trinkwasser gilt ebenfalls als Infektionsquelle. In zwei Übersichtsarbeiten (Koenraad *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1999) wurde von insgesamt 16 Ausbrüchen zwischen 1978 und 1997 weltweit berichtet, die durch Trinkwasser verursacht wurden. Meist wurden Zusammenhänge mit Einzelwasserversorgungen in ländlichen Gegenden gefunden, bei denen eine Kontamination durch tierische Fäkalien wahrscheinlich ist. In Skandinavien stellt das Trinken von Wasser aus scheinbar saubereren Gewässern eine Ursache für *Campylobacter*-Infektionen dar (Jones, 2001). In Fall-Kontroll-Studien in Québec (Michaud *et al.*, 2004) und Finnland (Schonberg-Norio *et al.*, 2004) wurde das Trinken von Leitungswasser insbesondere bei privaten Wasserversorgungen durch Schachtbrunnen als unabhängiger Risikofaktor für eine Infektion mit *Campylobacter* spp. identifiziert.

Ekdahl *et al.* (2005) bekräftigen in ihrer Arbeit die These, dass Fliegen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von *Campylobacter* spp. von der Umwelt auf den Menschen spielen könnten, wie auch bei *Shigella*, *Salmonella typhi* und *E. coli*. Sie können zum einen als mechanischer Vektor dienen, indem sie die Bakterien auf der Oberfläche tragen und zum anderen auch als biologischer Vektor durch Passagieren der Keime durch ihren Verdauungstrakt. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt insbesondere durch den Kontakt der Fliegen mit Lebensmitteln. Aufgrund der niedrigen Infektionsdosis von *Campylobacter* spp. von ca. 500 Keimen (Robinson *et al.*, 1981) ist dieser Weg durchaus vorstellbar und er würde auch die Saisonalität und das sporadische Auftreten der Erkrankung erklären. Allerdings bedarf es noch experimenteller und epidemiologischer Studien, die die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Fliegen in einer Umgebung mit möglichen Quellen für *Campylobacter* spp. wie z.B. Rinder- oder Geflügelmastbetriebe und der Inzidenz humaner Infektionen näher untersuchen.

In seltenen Fällen kann auch durch Kontakt mit infizierten Haustieren eine Übertragung von *Campylobacter* erfolgen (Schulze *et al.*, 2000; Kiehl, 2004). Es wurden Infektionen beschrieben, die vermutlich durch den Kontakt mit erkrankten jungen Katzen und Hunden verursacht wurden (Kist, 2006). Carrique-Mas *et al.* (2005) konnten bei der von ihnen untersuchten Gruppe von Kindern unter sechs Jahren ein erhöhtes Risiko für eine Infektion durch den Kontakt mit Hunden feststellen. Eine Abhängigkeit vom Alter des Tieres war allerdings nicht erkennbar.

Die Übertragung von Mensch zu Mensch spielt eine geringe Rolle und beschränkt sich dabei eher auf das Kleinkindesalter und auf immunsupprimierte Personen (Kist, 2006).

Campylobacter spp. werden damit in der Regel über den oralen Infektionsweg durch den Verzehr von Lebensmitteln und von als Trinkwasser verwendetem Oberflächenwasser auf den Menschen übertragen. Auch das Schwimmen in Oberflächenwasser kann durch orale Aufnahme von Wasser zur Infektion führen (Schonberg-Norio *et al.*, 2004; Kist, 2006).

Als beruflich bedingte Risikogruppe gelten Milchbauern, Arbeiter in der Geflügelhaltung und

-schlachtung, Metzger und Mitarbeiter in Schlachthöfen sowie Tierärzte. Aufgrund des häufigen Kontaktes mit Tieren und Schlachtkörpern ist bei diesen Berufsgruppen das Risiko einer *Campylobacter*-Infektion erhöht (Kist, 2006).

Reisen in warme Länder stellen einen weiteren epidemiologischen Risikofaktor dar. Da die Prävalenz von *Campylobacter* spp. in warmen Ländern höher ist, werden Infektionen signifikant häufiger auf Reisen erworben (Kist, 2006). Es konnte in Fallkontrollstudien gezeigt werden, dass *Campylobacter*-Infektionen die häufigste Ursache für Reisediarrhöen darstellen (Mølbak, 1998; Kist, 2006).

2.2.3. Saisonalität

Ein charakteristisches Kennzeichen der Epidemiologie der Campylobacteriose ist ihre ausgeprägte Saisonalität (Humphrey *et al.*, 2007). Im Allgemeinen werden in den Sommermonaten mehr Erkrankungen gemeldet als in den Wintermonaten (Adam *et al.*, 2004; Humphrey *et al.*, 2007; Anonymus, 2007a). In einer europäischen Studie konnte gezeigt werden, dass die saisonalen Höhepunkte zwischen den verschiedenen Ländern variieren (Nylen *et al.*, 2002). So konnte der Peak in Wales früher als in Schottland verzeichnet werden und in den nordischen Ländern trat eine weitere Verschiebung auf. Es gibt eine Reihe von Hypothesen zur Erklärung der Saisonalität von *Campylobacter*-Infektionen, die bei Humphrey *et al.* (2007) genauer beschrieben sind. In einigen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der Umgebungstemperatur und der Anzahl an gemeldeten Fällen von Infektionen festgestellt. Veränderungen im Befall von Geflügel oder anderen Tieren zur Lebensmittelproduktion konnten nicht direkt mit dem vermehrten Auftreten menschlicher Infektionen korreliert werden. Weitere Ursachen für die Saisonalität werden in der vermehrten Verbreitung von *Campylobacter* spp. in den Sommermonaten durch Zugvögel, junge Kaninchen, Welpen und auch Fliegen vermutet.

2.3. *Campylobacter*-Infektionen als lebensmittelassoziierte Erkrankung

Aufgrund der hohen Verbreitung von *Campylobacter* spp. bei Rindern, Schafen, Schweinen und Geflügel ist eine Kontamination der Fleischprodukte dieser Tiere kaum zu vermeiden. Die Kontaminationsraten unterscheiden sich dabei jedoch deutlich zwischen rotem und weißem Fleisch. Wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, liegen die Kontaminationsraten von Rind-, Schweine und Lammfleisch mit 2,7%, 2,0% und 6,0% deutlich unter denen von Geflügelfleisch mit Werten zwischen 30,2% bei Ente und 57,4% bei Hähnchen (Humphrey *et al.*, 2007). Die Ursachen dafür sind vor allem im Schlachtprozess begründet. Zum einen ist die Schlachtrate von Rindern, Schweinen und Schafen deutlich niedriger als bei Geflügel, was zu einem geringeren Eintrag von *Campylobacter* spp. in den Schlachtbetrieb führt. Zum anderen wird bei Geflügel die Haut, die am stärksten kontaminiert ist, in der Regel nicht entfernt (Corry *et al.*, 2001). Der wichtigste Grund für die geringere Belastung von rotem Fleisch ist aber in der langen Kühlung der Karkassen vor ihrem Eintritt in die Lebensmittelkette zu sehen. Bei der Kühlung kommt es gleichzeitig zum Austrocknen der Oberfläche, was zum Absterben von *Campylobacter* spp. führt (Humphrey *et al.*, 2007). Aufgrund der Bedeutung von Geflügel als Hauptursache für lebensmittelbedingte, humane Infektionen mit *Campylobacter* spp. sind insbesondere bei Geflügelschlachtbetrieben Kontrollmaßnahmen beim Schlachtprozess notwendig. Um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, sollten in erster Linie die Temperaturen der verschiedenen Prozessstufen eingehalten werden. Desinfektionsmaßnahmen, die regelmäßige Erneuerung von Brüh- und Kühlwasser, das Chlorieren von Kühlwasser und die Vermeidung von unnötigem Kontakt der Karkassen mit Oberflächen sind ebenso zu beachten (Mead *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997). Trotz der allgemeinen Annahme, dass *Campylobacter* spp. sehr empfindlich auf Umweltbedingungen außerhalb des Wirtsorganismus reagieren, konnte gezeigt werden, dass ein Überleben auf Hähnchenkarkassen bei niedrigen Temperaturen bis zu mehreren Tagen möglich ist. Die Mechanismen, wie sich die Keime an ungünstige Bedingungen anpassen, sind bislang nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *C. jejuni* bei 4°C metabolisch stark aktiv ist (Hazeleger *et al.*, 1998) und dass bei diesem Keim -anders als bei Salmonellen und *E. coli*- durch niedrige Temperaturen keine Hitzeempfindlichkeit hervorgerufen wird (Mattick *et al.*, 2003). Eine genaue Aufklärung, wie *Campylobacter* spp. auf die niedrigen Temperaturen, die bei allen Stufen des Produktionsprozesses eingehalten werden sollen, reagieren und wie sie diese überleben können, könnte eine Optimierung der Produktionsbedingungen ermöglichen. Prinzipiell wurde in Studien festgestellt, dass bei *Campylobacter*-positiven Herden auf allen Stufen des Schlachtprozesses hohe Keimzahlen vorliegen, wengleich das Brühen am Anfang des Prozesses zunächst zu einer Reduzierung der

Keimzahl auf der Karkasse führt und die Verwendung von gechlortem Wasch- bzw. Kühlwasser ebenfalls zu geringeren Kontaminationsraten führt (Corry *et al.*, 2001). Die Kontamination einer *Campylobacter*-freien Herde ist bei vorausgegangener Schlachtung einer *Campylobacter*-positiven Herde praktisch nicht zu vermeiden (Corry *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2007). Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die Behandlung der Hähnchenkarkassen mit heißem Wasser am Ende des Schlachtprozesses einen geringeren Effekt auf die Abtötung von *Campylobacter* spp. hat, als angenommen wurde (Purnell *et al.*, 2003). Es wird davon ausgegangen, dass die Bakterien durch ihre Fähigkeit, sich an Oberflächen anzuheften, hitzetoleranter werden. Eine weitere Ursache für den geringen Effekt dieser Maßnahme könnte darin liegen, dass die erwünschte Temperatur auf der Oberfläche der Karkasse nicht erreicht wird (Humphrey *et al.*, 2007). Neben der Bildung von Biofilmen auf der Hautoberfläche dringen die Bakterien auch in die Hautfalten und insbesondere in die Federfollikel ein, was zusätzlich die Entfernung durch Waschen und die Inaktivierung durch Hitze während des Schlachtprozesses erschwert (Corry *et al.*, 2001; Humphrey *et al.*, 2007). Möglichkeiten, um *Campylobacter*-freies Geflügelfleisch zu erhalten, sind vielmehr in physikalischen oder chemischen Verfahren zu sehen, durch die die Keime beim Endprodukt abgetötet werden. Bestrahlung ist dabei als am effektivsten einzustufen, während bei den chemischen Methoden das Tauchen in 10% Trinatriumphosphat Erfolg versprechend zu sein scheint (Corry *et al.*, 2001).

Bei der Zubereitung von Fleischprodukten, die mit *Campylobacter* spp. kontaminiert sein können, ist unbedingt auf ein ausreichendes Durchgaren zu achten. Zudem besteht die Gefahr von Kontaminationen anderer, bereits zubereiteter oder roh zu verzehrender Lebensmittel durch den direkten Kontakt mit kontaminierten Produkten bzw. durch den indirekten Kontakt über Gegenstände oder Oberflächen in der Küche. Eine gute Küchenhygiene, durch die vor allem durch Hände waschen und gründliche Säuberung der Arbeitsflächen und –geräte nach der Zubereitung von kritischen Produkten eine Verbreitung der Bakterien in der Küche vermieden wird, ist somit unerlässlich (Humphrey *et al.*, 2007).

Als weiteres kritisches Produkt sind rohe Muscheln zu sehen. Eine quantitative Risikoabschätzung in den Niederlanden ergab, dass beim Verzehr roher Muscheln ein beachtliches Infektionsrisiko besteht. Durch korrekt durchgeführtes Dampfgaren werden möglicherweise vorhandene Keime jedoch inaktiviert (Teunis *et al.*, 1997).

Frisches Obst und Gemüse stellen in der Regel kein Risiko für eine *Campylobacter*-Infektion dar. Dennoch ist zu beachten, dass zur Bewässerung und zum Waschen kein unbehandeltes, kontaminiertes Wasser verwendet wird. Bei der Zubereitung muss darauf geachtet werden, dass es zu keiner Kreuzkontamination durch andere kontaminierte Lebensmittel kommt (Humphrey *et al.*, 2007).

Von dem Konsum von Rohmilch ist auch bei einwandfreier Melkhygiene grundsätzlich

abzuraten. Eine korrekt durchgeführte Pasteurisation und die Vermeidung der Rekontamination von pasteurisierter Milch stellen effektive Maßnahmen zur Vermeidung einer Infektion durch Milch dar (Humphrey *et al.*, 2007).

Bei mit *Campylobacter* spp. kontaminierten Lebensmitteln ist die Problematik nicht in der Vermehrung der Keime im Lebensmittel zu sehen, da aufgrund der speziellen Wachstumsbedingungen bezüglich Gasatmosphäre und Temperatur in der Regel keine Vermehrung erfolgt. Die Herausforderung besteht vor allem im Hinblick auf die geringe Infektionsdosis vielmehr darin, ein Überleben der Keime im Lebensmittel zu vermeiden. Corry *et al.* (2001) verweisen in ihrer Übersichtsarbeit auf Studien, die Faktoren aufzeigen, die für das Überleben von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln relevant sind. Bei niedrigen Temperaturen (z.B. 4°C) können *Campylobacter* spp. besser überleben als bei höheren Temperaturen (z.B. 20°C). Bei einem pH-Wert von 6,4 ist die Überlebenswahrscheinlichkeit höher als bei 5,8. Ein Salzgehalt von unter 0,5% und ein möglichst geringer Sauerstoffgehalt begünstigen ebenfalls das Überleben. Aufgrund der Empfindlichkeit von *Campylobacter* spp. gegenüber Trockenheit ist ein Überleben auf trockenen Oberflächen praktisch nicht möglich.

2.4. Humanpathogene Bedeutung und Prophylaxe der Campylobacteriose

Die Campylobacteriose ist eine weltweit verbreitete Zoonose und die häufigste, bakteriell bedingte Durchfallerkrankung. Während Infektionen mit *Campylobacter* in Deutschland bis zum Jahr 2000 gemäß Bundesseuchengesetz unter der Meldekategorie „Enteritis infectiosa – übrige Formen“ erfasst wurden, werden sie seit 2001 mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) als eigene Kategorie geführt. Nach §7 IfSG ist der laboridiagnostische Nachweis bundesweit meldepflichtig (Anonymus, 2008a). Laut statistischen Angaben des RKI lag 2005 die Zahl der gemeldeten *Campylobacter*-Enteritiden mit 62129 Fällen erstmals über der Zahl der Salmonellosen von 52257 (Anonymus, 2006). 2006 traten mit ca. 52 000 gemeldeten Fällen etwa gleich viele Campylobacteriosen wie Salmonellosen auf (Anonymus, 2007). Im Jahr 2007 wurde jedoch wieder ein Anstieg der *Campylobacter*-Enteritiden mit 65785 über die Zahl der gemeldeten Salmonellosen mit 55155 verzeichnet (Anonymus, 2008).

Die *Campylobacter*-Enteritis tritt vor allem bei Kleinkindern unter vier Jahren, jungen Erwachsenen und immungeschwächten Personen auf (Anonymus, 2008b). Die Inkubationszeit beträgt zwei bis fünf Tage nach Infektion mit dem Erreger, die zumeist durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser erfolgt (Kist, 2006). Eine Infektionsdosis von 400 bis 500 Keimen ist ausreichend (Robinson *et al.*, 1981; Schulze *et al.*, 2000). Häufig kommt es zwölf bis 24 Stunden vor Auftreten der enteritischen Symptome zu einem

allgemeinen Krankheitsgefühl mit Kopf- und Rückenschmerzen. Bei der Enteritis kommt es zu starken Unterbauchkrämpfen und wässrig-breiigen Durchfällen wie bei einer Cholera-Infektion oder auch zu blutigen Durchfällen wie bei einer Shigellen-Infektion (Mansfield *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002; Adam *et al.*, 2004; Kiehl, 2004; Kist, 2006;). Als Begleiterscheinungen sind auch Fieber, Schwindel, Erbrechen, Kopf- und Muskelschmerzen zu beobachten. Die Erkrankung ist selbstlimitierend und klingt meist nach ca. einer Woche ohne antibiotische Behandlung ab (Anonymus, 2008b). Im Normalfall ist eine Therapie mit Wasser- und Elektrolytersatz ausreichend. Eine Erregerausscheidung mit bis zu 10^9 Keimen pro Gramm Stuhl tritt im Normalfall noch zwei bis drei Wochen nach Genesung auf (Kist, 2006). In ca. 5-10% der Fälle kommt es jedoch zu einem Rückfall (Schulze *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich oftmals um immunschwache Personen wie Krebs- oder Aidspatienten oder Organtransplantierte (Mansfield *et al.*, 2000). In diesem Fall ist eine Behandlung mit Erythromycin oder ersatzweise auch mit Tetracyclin angezeigt (Schulze *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002; Kiehl, 2004).

Das Infektionsrisiko kann durch Medikamente wie Protonenpumpenhemmer, die die Produktion der Magensäure senken, erhöht werden. Auch Eisen erleichtert das Infektionsgeschehen, weil es für die Toxinbildung von *Campylobacter* spp. benötigt wird. Eine intakte Darmflora hingegen verfügt über Siderophore, die das Eisen binden, und erschwert somit eine Infektion (Stein, 2004).

Eine Campylobacteriose kann in seltenen Fällen postinfektiöse Syndrome nach sich ziehen. Es wurden Septikämie, hämolytisch urämisches Syndrom (HUS), Colitis, Peritonitis, Pankreatitis, Cholezystitis, Meningitis, Enteropathien, Myokarditis, Endokarditis, Glomerulonephritis und Abgänge beobachtet (Anonymus, 2000; Schulze *et al.*, 2000; Kist, 2006).

Die bedeutendste Folgeerkrankung der *Campylobacter*-Enteritis ist das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), das bei 1-3‰ der Erkrankten auftritt (Kist, 2006). Hierbei handelt es sich um eine entzündliche Autoimmunerkrankung des peripheren Nervensystems, an der in den Industrieländern jährlich ein bis zwei von 100000 Menschen erkranken. Eine vorausgegangene Infektion mit *C. jejuni* ist bei 20–40% die häufigste Ursache der Erkrankung (Mansfield *et al.*, 2000; Kist, 2002). Die Symptome treten ca. ein bis drei Wochen nach der Infektion auf und erreichen ihr Maximum nach etwa einem Monat. Anfänglich ist ein Kribbeln und Taubheitsgefühl in den Fingern und Zehen fest zu stellen, das sich dann in Richtung Rumpf ausbreitet. Es kommt zu Gang- und Standataxien und zu Herzrhythmusstörungen. Bei 50–90% der Fälle tritt eine komplette Lähmung mit Atemschwäche auf. Durch Plasmapherese oder die Gabe von Immunglobulinen können 15% der Patienten nach etwa einem Jahr als vollständig geheilt eingestuft werden, während 6% sterben und die restlichen Patienten unter dauerhaften neurologischen Defiziten wie z.B. Fußheberschwäche, distalen Empfindungsstörungen oder Lähmungen leiden (Stein, 2004).

Man geht davon aus, dass bestimmte Serovare von *C. jejuni* (z.B. PEN O:19 oder PEN O:41) aufgrund von sialinsubstituierten Lipooligosacchariden als Bestandteile ihrer äußeren Membran Ähnlichkeiten mit der Oberflächenstruktur der peripheren Nervenzellen (sialinierte Ganglioside) aufweisen (Wassenaar *et al.*, 2000; Godschalk *et al.*, 2004; Kist, 2006). Dadurch kommt es im Zuge der Immunreaktion gegen den Erreger zur Autoimmunreaktion gegen die Nervenzellen. Die Folge ist eine Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen und somit die Zerstörung der Myelinscheide im Bereich der peripheren Nerven (Mansfield *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002; Stein, 2004; Kist, 2006). Betrifft die Neuropathie nur das Gesicht, so spricht man vom Miller-Fisher-Syndrom, das sich in einer Paralyse der Augenmuskulatur, Ataxie und Gesichtsmuskelschwäche manifestiert, was an das klinische Bild des Botulismus erinnert (Stein, 2004; Kist, 2006).

Schließlich entwickeln ein bis zwei Prozent der Patienten nach einer Infektion mit *Campylobacter* spp. eine reaktive Arthritis. Beim so genannten Reiter's Syndrom kommt es zu einer Autoimmunreaktion in den Gelenken. Besonders häufig ist das Kniegelenk betroffen (Kist, 2006). Die Erkrankung wird vor allem bei Personen beobachtet, die HLA-B27 (Human Leucocyte Antigen B27) positiv sind. Es wird eine Ähnlichkeit dieses Antigens mit bakteriellen Antigenen vermutet. Bei den Patienten kann ein erhöhter Titer an IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern nachgewiesen werden. Zu den Gelenkschmerzen treten außerdem Konjunktivitis und Urethritis hinzu. Eine Behandlung mit Ciprofloxacin kann die Symptome lindern (Mansfield *et al.*, 2000; Stein, 2004).

Derzeit sind die Möglichkeiten zur Prophylaxe von *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen unbefriedigend. Aufgrund der unter 2.3 beschriebenen Übertragungswege gilt eine konsequente Einhaltung der persönlichen Hygiene und der Küchenhygiene als wichtigste Schutzmaßnahme gegen eine *Campylobacter*-Infektion. Insbesondere bei der Zubereitung von Geflügel ist auf einen hygienischen Umgang zu achten. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das gründliche Durchgaren von Fleisch vor dem Verzehr. Auch das Trinken von Rohmilch und von möglicherweise kontaminiertem Wasser ist zu vermeiden. Da insbesondere von nicht pasteurisierter Milch Ausbrüche ausgelöst wurden, ist seit 1997 laut Milchverordnung die Abgabe roher Milch, einschließlich Vorzugsmilch, in Einrichtungen der Gemeinschaftsverpflegung nicht mehr gestattet (Mansfield *et al.*, 2000; Schulze *et al.*, 2000). Das Robert Koch-Institut rät prinzipiell vom Verzehr von rohen Lebensmitteln tierischer Herkunft (einschließlich Rohmilch als Hof- oder Vorzugsmilch) durch Säuglinge, Kleinkinder sowie durch alte und abwehrgeschwächte Menschen ab (RKI, 2005).

3. Nachweis, Identifizierung und Charakterisierung thermophiler *Campylobacter* spp.

3.1. Kulturelle Nachweismethoden

3.1.1. Isolierung und Kultivierung

Da es sich bei thermophilen *Campylobacter* spp. um sehr anspruchsvolle Organismen handelt, ist ihre Handhabung im Labor im Allgemeinen nicht unproblematisch.

Bei Lebensmittel-, Wasser- und anderen Umweltproben wird aufgrund der niedrigen Keimzahlen generell eine Voranreicherung in einem flüssigen Selektivnährmedium empfohlen. Hierfür stehen die Preston-Bouillon (Bolton und Robertson, 1982), die Bolton-Bouillon (Hunt *et al.*, 2001), die Exeter-Bouillon nach De Boer und Humphrey (1991) oder das Medium nach Park und Sanders (1991) zur Verfügung. Diese Medien enthalten alle Pepton und Fleisch- oder Hefeextrakt als Energiequellen. Blut oder andere Zusätze wie Natriumpyruvat, Natriummetabisulfit und Eisensulfat sollen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verhindern, die das Wachstum von *Campylobacter* spp. beeinträchtigen. Zur Unterdrückung der Begleitflora werden verschiedene Antibiotika wie Vancomycin oder Rifampicin (hemmen Gram-positive Kokken), Polymyxin B, Trimethoprim oder Cephalosporine (hemmen *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden) und Amphotericin B (hemmt Hefen und Pilze) zugegeben (Donnison, 2003).

Die Anreicherungsbouillon wird üblicherweise für 48 Stunden bei 42°C unter mikroaerober Atmosphäre (5% Sauerstoff, 10% Kohlendioxid, 85% Stickstoff) inkubiert. Um sublethal geschädigte Zellen wieder zu beleben, wird von einigen Autoren empfohlen, die Voranreicherung zunächst für vier Stunden bei 37°C und dann erst bei 42°C durchzuführen (Humphrey und Muscat, 1989).

Die Isolierung der Keime aus der Voranreicherung erfolgt in der Regel auch auf Selektivnährböden. Häufig verwendet werden der Nährboden nach Karmali *et al.* (1986) und der mCCDA Nährboden (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholat Agar) nach Hutchinson und Bolton (1984). Weitere Selektivnährböden für *Campylobacter* spp. sind Skirrow-, Butzler- und Preston-Agar (Donnison, 2003).

Einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen Nährböden zur Isolierung thermophiler *Campylobacter* spp. sowie über ihre Vor- und Nachteile bezüglich Zusammensetzung und Eignung zur Kultivierung der verschiedenen Spezies geben Corry *et al.* (2003).

Eine weitere Möglichkeit, um *Campylobacter* spp. selektiv zu isolieren, stellt die Membranfiltration dar. Dabei wird die bebrütete Anreicherungsbouillon (selektiv oder nicht-selektiv) durch ein steriles Membranfiltersystem mit einer Porengröße von 0,45 oder 0,65 µm auf den Nährboden (selektiv oder nicht-selektiv) gebracht. Wilson und Aitchison (2007) konnten

durch nicht-selektive Anreicherung in Kombination mit der Filtration auf Preston Selektivnährboden die höchsten Isolationsraten erzielen.

Die Inkubation der mit Anreicherungsmedium beimpften Selektivnährböden wird bei 42°C unter mikroaerober Atmosphäre für 48 Stunden durchgeführt. Zur Identifizierung werden verdächtige Kolonien in der Regel auf nicht-selektiven Nährböden (z.B. Blutagar) subkultiviert.

Mit der ISO 10272:2006 (Anonymus, 2006a) wurde ein internationales Verfahren zum Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. standardisiert (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Campylobacter* growing at 41,5°C). Das Verfahren ist nachfolgend schematisch dargestellt.

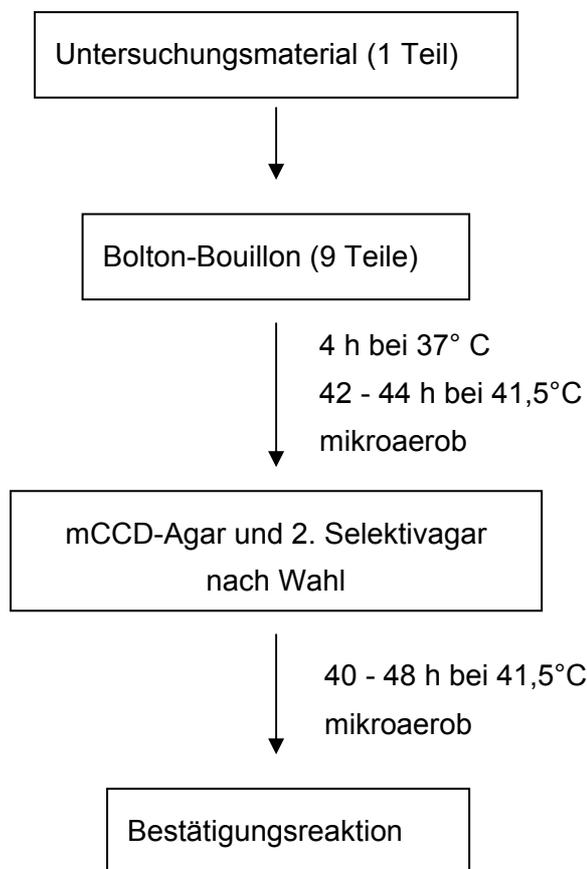


Abbildung 1 Flussdiagramm der ISO 10272-1:2006 (Anonymus, 2006a)

Es gibt auch Empfehlungen anderer Behörden wie der FDA (US Food and Drug Administration) oder den PHLS (UK Public Health Laboratory Services) zum Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp., die bei Donnison (2003) genauer beschrieben sind.

3.1.2. Bestätigung

Campylobacter spp. bilden charakteristische flache, feuchte, glänzende, graue bis weißliche Kolonien, die entweder scharf begrenzt sind oder aber schwärmen.

Zur Bestätigung der auf dem Nährboden gewachsenen präsumptiven Kolonien wird ein Nativpräparat erstellt und im Interferenzphasenmikroskop beurteilt. Es sind die charakteristische, spiralförmige Form von *Campylobacter* spp. sowie ihre typischen, korkenzieherartigen Bewegungen erkennbar. Bei älteren Kolonien können auch kokkoide Formen auftreten. Daher sollte als zusätzliche Bestätigung auch ein Präparat auf Gram-negative Anfärbung untersucht werden (Nachamkin *et al.*, 2000). Eine weitere Verifizierung liefern eine positive Oxidase-Reaktion und der Latexagglutinationstest (Schulze *et al.*, 2000).

Eine Differenzierung nach Spezies bzw. Subspezies auf phänotypischer Ebene ist durch Überprüfung verschiedener biochemischer Reaktionen wie beispielsweise der Hippurat- und Katalasehydrolyse, der H₂S-Produktion oder der Resistenz gegenüber verschiedener Antibiotika möglich (Donnison, 2003). Tabelle 1 gibt einen Überblick über Kriterien zur Differenzierung thermophiler *Campylobacter* spp..

Tabelle 1 Typische biochemische Reaktionen thermophiler *Campylobacter* spp. (modifiziert nach Garrity *et al.*, 2002 und Donnison, 2003)

Merkmal	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Katalase	+	m	+	+	- bzw. (+)
Urease	-	-	-	v	-
Hippurathydrolyse	+	+	-	-	-
Indoxylacetat- hydrolyse	+	+	+	-	+
Nitratreduktion	+	-	+	+	+
H ₂ S-Produktion	-	-	- bzw. (+)	-	-
Nalidixinsäure	s	s	s	v	s
Cephalothin	r	s	r	r	s

+ = positiv, (+) = schwach positiv, - = negativ, m = 60-93% positiv, v = variabel, r = resistent, s = sensitiv

Ein kommerziell erhältliches Testkit zur biochemischen Differenzierung ist der api[®] Campy (bioMérieux, Frankreich). Allerdings ist die Identifizierung anhand von biochemischen Reaktionen aufgrund der hohen genetischen Variabilität und damit unterschiedlichster und sich ändernder phänotypischer Eigenschaften von *Campylobacter* spp. nicht sehr zuverlässig (Schulze *et al.*, 2000; McClure *et al.*, 2002). Beispielsweise ist die Hippurathydrolyse-Reaktion zum einen sehr subjektiv ablesbar und zum anderen konnten auch

Hippurathydrolyse-negative Isolate von *C. jejuni* bestimmt werden (Totten *et al.*, 1987; Steinbrueckner *et al.*, 1999). Auch die zunehmende Resistenz von *C. jejuni* und *C. coli* gegenüber Nalidixinsäure (Jesse *et al.*, 2006) erschwert eine eindeutige Speziesdifferenzierung anhand dieses Kriteriums. Daher ist es sinnvoll, genotypische Methoden zur Verifizierung biochemischer Ergebnisse hinzu zu ziehen (siehe 3.3).

3.2. Immunologische Typisierungs- und Nachweisverfahren

Zur Typisierung von *Campylobacter* spp. mittels serologischer Verfahren wurde zum einen das Penner-System, das auf der passiven Hämagglutination hitzestabiler Oberflächenantigene basiert, entwickelt (Penner und Hennessy, 1980; Penner *et al.*, 1983). Das Lior-System hingegen nutzt die hitzelablen Oberflächenantigene zur bakteriellen Agglutination (Lior *et al.*, 1982). Allerdings sind diese Verfahren dadurch limitiert, dass viele Stämme aufgrund fehlender Antiseren nicht typisierbar sind oder Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen auftreten (Logan und Trust, 1983; Patton *et al.*, 1985; Wassenaar und Newell, 2000). Auch mit einem neueren Testsystem, das zur Erweiterung des Penner-Systems vorgeschlagen wurde und auf der direkten Agglutination basiert (Frost *et al.*, 1998), konnten diese Nachteile nicht ausgeräumt werden (McKay, 2001). Eine reproduzierbare Typisierung ist zudem aufgrund der hohen Antigenvariabilität von *Campylobacter* spp., die durch die hohe genetische Diversität der Gattung bedingt ist, kaum möglich (Logan und Trust, 1983; Suerbaum *et al.*, 2001; Dingle *et al.*, 2002; Meinersmann *et al.*, 2002). Um eine genaue Typisierung von *Campylobacter* spp. zur Aufklärung der Herkunft und Zusammenhänge zwischen Isolaten unterschiedlichen Ursprungs zu ermöglichen, sollten daher phänotypische Methoden mit genotypischen (siehe 3.3.2) kombiniert werden (Wassenaar und Newell, 2000).

Ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter* spp. stellt der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) dar. Hierbei werden *Campylobacter*-Antigene mithilfe von Anti-*Campylobacter*-Antikörpern nachgewiesen, indem es zu einer enzymatischen Reaktion an den gebundenen Antikörpern kommt. Allerdings haben nur wenige Studien gemeinsame Antigene thermophiler *Campylobacter* spp. identifiziert, welche als Zielepitope für Antikörper fungieren könnten (Mills *et al.*, 1986; Taylor und Chang, 1987; Qian *et al.*, 2007). Mills *et al.* (1986) stellten außerdem fest, dass antigene Determinanten von *Campylobacter* spp. wie beispielsweise Flagellinprotein im nativen Zustand nicht reaktiv sind. Auch Chart *et al.* (1996) konnten zeigen, dass bestimmte Außenmembranproteine und Lipopolysaccharide nur *in vivo* exprimiert werden und bei *in vitro* kultivierten Zellen keine Agglutination mit Antiseren auftritt. Ein gut funktionierendes System auf Basis der Antigen-Antikörper-Reaktion ist das kommerziell erhältliche miniVIDAS® CAM-Assay (bioMérieux,

Frankreich) zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* nach zweitägiger Anreicherung in einem flüssigen Selektivnährmedium. Dabei binden *Campylobacter*-Antigene in einer Probe an Anti-*Campylobacter*-Antikörper, die sich im Festphasenrezeptor des Kits befinden. Nicht gebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt. Im Anschluss werden mit alkalischer Phosphatase markierte Antikörper zugegeben, die wiederum an die gebundenen *Campylobacter*-Antigene binden (Sandwich-ELISA). Ungebundenes Konjugat wird in weiteren Waschschritten entfernt und am Schluss wird das Enzymsubstrat (4-Methyl-Umbelliferyl-Phosphat) zugegeben, welches durch den Enzymkomplex in das fluoreszierende Produkt (4-Methyl-Umbelliferon) umgesetzt wird. Die Fluoreszenz wird abschließend photometrisch bei 450 nm bestimmt und die Probe in Anlehnung an den gespeicherten Standard als positiv ($> 0,1$) oder negativ ($< 0,1$) bewertet. Das System wurde von verschiedenen Autoren im Vergleich zu kulturellen Methoden getestet (Elmer-Englhard *et al.*, 1998; Hoorfar *et al.*, 1999; Jacobs-Reitsma *et al.*, 1999 und 2003; Borck *et al.*, 2002; Trigo *et al.*, 2002). Es wurde jeweils eine hohe Sensitivität und Spezifität erzielt. Auch die schnellere und einfachere Durchführbarkeit im Vergleich zur Referenzmethode wurde von den Autoren positiv bewertet.

Der Singlepath *Campylobacter*[®] Lateral Flow Assay (Merck, Darmstadt) basiert auf dem immunochromatografischen Prinzip. Dabei fließen Gold-markierte Antikörper, an die *C. jejuni* und *C. coli* gebunden sind, über eine Nitrocellulose-Membran. Es kommt zur Bindung an immobilisierte, spezifische Fang-Antikörper und zu einer Farbreaktion. Das System ermöglicht den schnellen Nachweis von *Campylobacter* spp. in einer angereicherten Lebensmittelprobe. Bubert *et al.* (2004) wiesen in ihrer Studie eine hohe Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum kulturellen Verfahren und zum VIDAS[®]-Test (bioMérieux, Frankreich) nach. Die Nachweisgrenze des Systems lag bei 10^5 - 10^6 KBE/ml Anreicherungsbouillon.

Immunologische Verfahren werden auch zur Aufkonzentrierung von *Campylobacter* spp. und zur Ausschaltung von Matrixeffekten in Lebensmittelproben angewendet. Bei der immunomagnetischen Separation (IMS) werden die Keime aufgrund von Antigen-Antikörper-Reaktionen an kleine Metallpartikel („Beads“) gebunden und mittels eines Magneten isoliert. Nach mehreren Waschschritten können die Beads mit den gebundenen Bakterien verschiedenen Nachweisverfahren unterzogen werden. In der Literatur sind einige Untersuchungen beschrieben, bei denen dieses Verfahren auch zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter* angewendet wurde (Docherty *et al.*, 1996; Lamoureux *et al.*, 1997; Waller *et al.*, 2000; Che *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). Waller *et al.* (2000) gelang ohne Voranreicherung der Nachweis von einer Zelle pro ml Probe durch die Kombination von IMS mit PCR innerhalb von acht Stunden. Docherty *et al.* (1996) konnten nach 18-stündiger Voranreicherung 420 KBE pro Gramm Geflügelprobe nachweisen. Eine effektive Anwendung

dieses Verfahrens für *Campylobacter* spp. könnte vor allem durch die mangelnde Verfügbarkeit von Antikörpern mit hoher Affinität und Spezifität für das Zielpathogen aufgrund der oben beschriebenen Antigenvariabilität von *Campylobacter* spp. erschwert werden. Das einzige kommerziell erhältliche Kit zur immunomagnetischen Separation von *Campylobacter* spp. wird neuerdings von der Firma Matrix (UK) angeboten. Eigene Studien zur Verkürzung der Voranreicherungszeit von Lebensmittelproben durch Anwendung dieses Kits zeigten jedoch, dass bei der Untersuchung von *Campylobacter*-positiven Proben nach 24 Stunden Voranreicherung zum Teil kein oder nur ein schwacher Nachweis mittels real-time PCR möglich ist. Bei der parallelen Untersuchung von Proben mit und ohne Anwendung des Aufkonzentrierungsschrittes waren die Ergebnisse der Proben, bei denen keine IMS durchgeführt worden war, sogar stärker positiv. Somit konnte das System zur immunomagnetischen Separation von *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln nicht überzeugen, da kein Vorteil gegenüber der Untersuchung der Proben nach 24 Stunden ohne Anwendung dieses Verfahrens festzustellen war (Ergebnisse unveröffentlicht).

3.3. Molekularbiologische Verfahren

3.3.1. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die unter 3.1 beschriebenen bakteriologischen Nachweisverfahren für thermophile *Campylobacter* spp. nehmen in der Regel mindestens vier Tage und bis zur Differenzierung auf Speziesebene sogar bis zu acht Tage in Anspruch. Molekularbiologische Nachweismethoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase chain reaction) bieten eine gute Alternative zur kulturellen Diagnostik, da bereits nach 48-stündiger kultureller Voranreicherung ein Nachweis bzw. eine Differenzierung innerhalb weniger Stunden möglich ist. Um eine PCR durchführen zu können, muss zunächst Nukleinsäure aus dem Probenmaterial extrahiert werden. Dies kann durch eine einfache Kochmethode (z.B. 15 Minuten bei 95°C), durch die Zugabe von Proteinase K und Lysepuffer und Inkubation bei 56°C für etwa eine Stunde mit anschließendem Aufkochen oder durch die Anwendung handelsüblicher Extraktionskits erfolgen (Schulze *et al.*, 2000).

Das Prinzip der PCR basiert auf der Amplifizierung und Detektion spezifischer DNA-Sequenzen. Dabei läuft ein sich wiederholender Prozess ab, bei dem 30-50 Zyklen bestehend aus Denaturierungsphase (ca. 95°C), Primer-Annealingphase (zw. 37°C und 65°C) und Extensionsphase (72°C) durchlaufen werden. Da es theoretisch bei jedem Zyklus zur Verdoppelung der Ziel-DNA kommt, steigt das PCR-Produkt im Verlauf exponentiell an (Lim, 1998).

Bei der konventionellen PCR wird das Amplifikat im Anschluss an die PCR mittels

Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Mittlerweile werden vermehrt real-time PCR-Methoden angewendet, bei denen Amplifizierung und Detektion durch den Einsatz von fluoreszierenden Farbstoffen zeitgleich stattfinden. Die Menge des PCR-Produktes wird dabei in jedem Zyklus aufgezeichnet und es entsteht eine dem Wachstum von Bakterien ähnliche Kurve, die aus einer lag-Phase, einer exponentiellen log-Phase und einer Plateau-Phase besteht. Der so genannte Ct-Wert (threshold cycle) beschreibt den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Fluoreszenzsignal und Menge des gebildeten PCR-Produktes kann bei der real-time PCR die Ausgangsmenge an DNA auch quantitativ bestimmt werden. Höhere Ausgangsmengen führen zu einer Verschiebung der Kurve nach links und somit zu einem niedrigeren Ct-Wert (Wittwer, 2001). Enthält der Testansatz keine Ziel-DNA, wird der Schwellenwert im gesamten Verlauf der PCR aufgrund mangelnder Fluoreszenz nicht überschritten. Um die Ausgangskonzentration quantitativ bestimmen zu können, werden Standardreihen mit Referenz-DNA bekannter Konzentration mitgeführt (Rasmussen, 2001).

Die unmittelbare Bestätigung der Spezifität eines gebildeten PCR-Produktes ist durch den Einsatz von DNA-Sonden möglich. Bei den verschiedenen Sondentypen werden im Wesentlichen zwei verschiedene Arten der Lichtemission genutzt.

Das erste Prinzip basiert auf dem so genannten „**Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer**“ (**FRET**). Dabei wird ein Donor-Fluorophor von der Lichtquelle angeregt, welches die Energie auf das Akzeptor-Fluorophor überträgt. Die Emission der aufgenommenen Energie durch das Akzeptor-Fluorophor wird schließlich vom Gerät gemessen. Die Übertragung der Energie kann nur erfolgen, wenn sich die Fluorophore in räumlicher Nähe zueinander befinden. Bei der real-time PCR werden zwei Hybridisierungssonden in den Testansatz gegeben, von denen die eine am 3`-Ende mit dem Donor-Fluorophor und die andere am 5`-Ende mit dem Akzeptor-Fluorophor markiert ist. Die Sequenzen der Sonden sind so gewählt, dass sie sich im Abstand weniger Basen an die einzelsträngige DNA anlagern und es so zur Energieübertragung und zur Detektion eines Signals kommt. Werden die DNA-Stränge durch die Polymerase während der Extensionsphase ergänzt, kommt es zur Freisetzung der Sonden und erst im nächsten Zyklus zu einer erneuten Anlagerung. Dieses Prinzip findet Anwendung bei der LightCycler[®]-Technologie (Roche Diagnostics, Mannheim) (Rasmussen, 2001; Geller, 2003).

Beim zweiten Prinzip wird eine **Hydrolyse- bzw. TaqMan[®]-Sonde** eingesetzt, die mit einem Reporter-Fluorophor und einem Löschmolekül, dem Quencher, markiert ist. Während der Annealingphase der PCR hybridisiert die Sonde mit der einzelsträngigen DNA. Der Reporter wird durch die Lichtquelle angeregt, die Fluoreszenz wird jedoch durch den Quencher unterdrückt. Während der Kettenverlängerung durch die Taq-DNA-Polymerase kommt es

aufgrund deren 5'-3'-Exonukleaseaktivität zur Abspaltung der Sonde in einzelne Basen. Dies führt zur Trennung von Reporter und Quencher und somit zum Leuchten des Reporters, das als Signal im Fluoreszenzkanal detektiert wird (Rasmussen, 2001; Geller, 2003).

Mittlerweile wird eine Reihe verschiedener Sonden angeboten, die sich durch ihren chemischen Aufbau von den klassischen TaqMan®-Sonden unterscheiden und verschiedene Vorteile aufweisen sollen. In erster Linie sollen sie eine Erhöhung des Fluoreszenzsignales ermöglichen und trotz kürzerer Sequenzen eine starke Bindung der Sonde an die Ziel-DNA während der Annealingphase gewährleisten. Ein Beispiel hierfür sind Molecular Beacons, bei denen es durch selbstkomplementäre Enden zur Bildung einer Haarnadelstruktur und zur Annäherung von Reporter und Quencher kommt. In Gegenwart einer einzelsträngigen spezifischen DNA-Sequenz falten sich Molecular Beacons auf und hybridisieren mit ihrem mittleren Teil mit der DNA-Sequenz. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und das vom Reporter emittierte Licht kann gemessen werden (Geller, 2003). Bei der so genannten Scorpion Technologie ist die Sonde kovalent an einen Primer gebunden. Die Sonde liegt ebenfalls in einer Haarnadelstruktur vor, die sich erst öffnet, wenn durch Anlagerung des Primers und Extension durch die Polymerase ein komplementärer Strang der Ziel-DNA synthetisiert wurde (Thelwell *et al.*, 2000). Bei LNA (Locked Nucleic Acid)-Sonden kommt es durch den Einbau von LNA-Monomeren zur Erhöhung der thermischen Stabilität des Komplexes aus Sonde und Ziel-DNA (Kumar *et al.*, 1998). MGB (Minor Groove Binder)-Sonden haben am 3'-Ende einen Rest, der sich in den DNA-Komplex einlagert und so die Hybridisierung der Sonde stabilisiert (Kutyavin *et al.*, 2003). Bislang wurden nur wenige Studien zum Vergleich der verschiedenen Technologien veröffentlicht. Costa *et al.* (2004) und Reynisson *et al.* (2006) stellten in ihren Studien eine höhere Effizienz der LNA-Sonden gegenüber gewöhnlichen TaqMan®-Sonden fest. Zhao *et al.* (2005) erzielten mit MGB-Sonden bessere Ergebnisse als mit normalen TaqMan®-Sonden.

Bei einer Multiplex real-time PCR werden in einem PCR-Ansatz mehrere Sonden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, eingesetzt, um zwischen verschiedenen Amplifikaten zu unterscheiden. Die maximal mögliche Anzahl der unterschiedlichen Sonden ist durch die Verfügbarkeit von Farbstoffen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden und Licht emittieren sowie durch entsprechende Quencher limitiert. Desweiteren müssen die real-time PCR-Geräte über Lichtquellen verfügen, die über einen großen Wellenlängenbereich Licht emittieren, und optische Filter enthalten, die eine Überlappung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorophore minimieren (Mackay, 2004).

Zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. wurden bereits eine Vielzahl verschiedener konventioneller wie auch real-time PCR-Systeme veröffentlicht, die auf dem Nachweis verschiedener Zielgene basieren (siehe Tabelle 2). Das erste PCR-System, das

für *C. jejuni* und *C. coli* vorgestellt wurde, basiert auf der Vervielfältigung und dem Nachweis des Flagellin A-Gens. Flagellin ist Bestandteil der Geißel von *Campylobacter* spp. und die beiden Untereinheiten werden durch die Gene *flaA* und *flaB* kodiert. Die Genabschnitte enthalten sowohl hoch konservierte als auch variable Regionen, die genutzt werden können, um verschiedene *Campylobacter* Spezies gleichzeitig oder getrennt nachzuweisen (Schulze *et al.*, 2000). Das ursprüngliche System von Oyoko *et al.* (1992) weist durch Hybridisierung des Amplifikates mittels einer Digoxigenin-markierten Sonde DNA von *C. jejuni* und *C. coli* nach. Es existiert eine Reihe weiterer Primer-Systeme, die auf Sequenzen der Flagellin Gene abzielen (siehe Tabelle 2).

Die für *Campylobacter* spp. veröffentlichten PCR-Nachweissysteme erfassen mit den entsprechenden Primerpaaren und Sonden entweder mehrere Spezies gleichzeitig oder sind für eine Spezies spezifisch (siehe Tabelle 2). Durch Kombination verschiedener spezifischer Primerpaare und Sonden (Multiplex-Ansatz) können verschiedene Spezies gleichzeitig erfasst und differenziert werden. Es wurde eine Reihe von konventionellen Multiplex PCR-Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* veröffentlicht (Gonzalez *et al.*, 1997; Denis *et al.*, 1999; Houg *et al.*, 2001; Englen *et al.*, 2002; Persson und Olsen, 2005; Nayak *et al.*, 2005; Samosornsuk *et al.*, 2007). Debruyne *et al.* (2008) verglichen in ihrer Studie fünf verschiedene Multiplex PCR-Verfahren hinsichtlich Selektivität und empfehlen die Systeme von Nayak *et al.* (2005) und Englen *et al.* (2002) als zuverlässige Methoden zur einfachen und schnellen Unterscheidung zwischen *C. jejuni* und *C. coli*. Zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* mittels Multiplex PCR existieren nur wenige PCR-Verfahren (Wang *et al.*, 2002; Chuma *et al.*, 2002; Klena *et al.*, 2004; Khan und Edge, 2007; Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007). Der Einsatz von Multiplex real-time PCR-Verfahren zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. wurde bislang nur in wenigen Publikationen vorgestellt (Best *et al.*, 2003; La Gier *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007). Einen Überblick über veröffentlichte PCR-Nachweissysteme für *Campylobacter* spp. mit ihren Zielgenen und Spezifitäten gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: PCR-Nachweissysteme für thermophile *Campylobacter* spp.

Zielgen	Kodiert für	Nachweis/ Differenzierung	Referenz	Analyseverfahren
16S rDNA	16S rRNA	Spezifisch für <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Van Camp <i>et al.</i> , 1993	Konventionelle PCR
			Giesendorf <i>et al.</i> , 1995	Konventionelle PCR
			Lübeck <i>et al.</i> , 2003	Konventionelle PCR
		Spezifisch für <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i>	Perelle <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hybridisierungssonden)
			Josefsen <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
		Abu-Halaweh <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hybridisierungssonden)	
		Spezifisch für <i>C. lari</i>	Oyarzabal <i>et al.</i> , 1997	Konventionelle PCR
23 rDNA	23 rRNA	Differenzierung thermophiler <i>Campylobacter</i> spp.	Eyers <i>et al.</i> , 1993	Konventionelle PCR
		Spezifisch für thermophile <i>Campylobacter</i> spp.	Fermer <i>et al.</i> , 1999	Konventionelle PCR
16S-23S rDNA ITS	-	Differenzierung von <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. lari</i>	Khan und Edge, 2007	Konventionelle PCR
<i>asp</i>	Aspartatkinase	Spezifisch für <i>C. coli</i>	Linton <i>et al.</i> , 1997; Persson und Olsen, 2005; Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
<i>cadF</i>	Fibronektin-bindungsprotein	Spezifisch für <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Konkel <i>et al.</i> , 1999; Nayak <i>et al.</i> , 2005	Konventionelle PCR
		Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Cheng und Griffiths, 2003; Oliveira <i>et al.</i> , 2005	Real-time PCR (SYBR Green I)
<i>ceuE</i>	Periplasmatisches Substratbindungsprotein		Denis <i>et al.</i> , 1999	Konventionelle PCR
		Spezifisch für <i>C. coli</i>	Englen <i>et al.</i> , 2002; Nayak <i>et al.</i> , 2005	Konventionelle PCR

LITERATUR

			Best <i>et al.</i> , 2003	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
			Hong <i>et al.</i> , 2007	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
		Differenzierung von <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Gonzalez <i>et al.</i> , 1997	Konventionelle PCR
			Houng <i>et al.</i> , 2001	konventionelle PCR
<i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> , <i>cdtC</i>	Cytolethal Distending Toxin	Differenzierung von <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> und <i>C. fetus</i>	Samosornsuk <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
			Oyofu <i>et al.</i> , 1992	Konventionelle PCR
			Owen <i>et al.</i> , 1993	Konventionelle PCR
		Spezifisch für <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Wegmüller <i>et al.</i> , 1993	Konventionelle PCR
			Rasmussen <i>et al.</i> , 1996	konventionelle PCR
			Mäde <i>et al.</i> , 2000	Real-time-PCR (Hydrolysesonde)
<i>flaA</i>	Flagellin A	Spezifisch für <i>C. lari</i>	Sekizuka <i>et al.</i> , 2005	Konventionelle PCR
			Birkenhead <i>et al.</i> , 1993	Konventionelle PCR
		Differenzierung von <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Nachamkin <i>et al.</i> , 1993 bzw. 1996	Konventionelle PCR
		Differenzierung von <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> und <i>C. upsaliensis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002	Konventionelle PCR
<i>glyA</i>	Serin-Hydroxy- methyltransferase	Spezifisch für <i>C. lari</i>	Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
		Spezifisch für <i>C. coli</i>	La Gier <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
			Ragimbeau <i>et al.</i> , 1998	Konventionelle PCR
<i>gyrA</i>	Gyrase	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Iijima <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
			Menard <i>et al.</i> , 2005	Real-time PCR (Hybridisierungssonden)
<i>hipO</i>	Hippurikase	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Linton <i>et al.</i> , 1997; Englen <i>et al.</i> , 2002	Konventionelle PCR

LITERATUR

			Wang <i>et al.</i> , 2002	Konventionelle PCR
			La Gier <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
			Persson und Olsen, 2005	Konventionelle PCR
			Hong <i>et al.</i> , 2007	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
<i>lpxA</i>	UDP-N-Acetylglucosamin-Acyltransferase	Differenzierung thermophiler <i>Campylobacter</i> spp. Spezifisch für <i>C. upsaliensis</i>	Klena <i>et al.</i> , 2004	Konventionelle PCR
			Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
<i>mapA</i>	Membran-assoziiertes Protein	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Stucki <i>et al.</i> , 1995	Konventionelle PCR
			Denis <i>et al.</i> , 1999	Konventionelle PCR
			Best <i>et al.</i> , 2003	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
<i>napA</i> und <i>napB</i>	Nitrat-Reduktase	Differenzierung von <i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> und <i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	Miller <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
<i>yphC</i>	Untereinheit der GTPase	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Iijima <i>et al.</i> , 2004	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
unbekannt	Periplasmatische Proteine	Differenzierung von <i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	Van de Giessen <i>et al.</i> , 1998	Konventionelle PCR
VS1 Sequenz	unbekannt	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Stonnet und Guesdon, 1993	Konventionelle PCR
			Yang <i>et al.</i> , 2003; Debretsion <i>et al.</i> , 2007	Real-time PCR (Hydrolysesonde)
unbekannt	Putative Oxidoreduktase	Spezifisch für <i>C. jejuni</i>	Wang <i>et al.</i> , 1992; Yamazaki-Matsune <i>et al.</i> , 2007	Konventionelle PCR
			Winters und Slavik, 1995; Nayak <i>et al.</i> , 2005	Konventionelle PCR
			Nogva <i>et al.</i> , 2000	Real-time PCR (Hydrolysesonde)

In der Arbeit von Lick *et al.* (2007) wurden verschiedene PCR-Nachweismethoden zur Identifizierung thermophiler *Campylobacter* spp. auf ihre Spezifität und Eignung für die PCR-Routinediagnostik untersucht und miteinander verglichen, um dem Leser die Wahl einer geeigneten Methode zu erleichtern. Dabei wurde von Lick *et al.* (2007) festgestellt, dass die Inklusivität bei allen in die Studie einbezogenen PCR-Verfahren sehr gut war, es jedoch bei der Exklusivität Unsicherheiten gab. Die real-time PCR nach Perelle *et al.* (2004) sowie die Methode nach Best *et al.* (2003) erzielten in der Spezifität und in der Eignung für die PCR-Routinediagnostik die besten Ergebnisse. Die auf dem 16S rRNA-Gen basierende Methode nach Perelle *et al.* (2004) erfasst gleichzeitig *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* und eignet sich daher als Screenigmethode für die Routinediagnostik. Das LightCycler®-System wurde von Josefsen *et al.* (2004) in ein TaqMan®-System transformiert und ist somit auf verschiedensten real-time PCR-Thermocyclern anwendbar. Mit der Methode nach Best *et al.* (2003) können zuverlässig *C. jejuni* und *C. coli* differenziert werden. Lick *et al.* (2007) weisen darauf hin, dass sich grundsätzlich die Kombination von zwei PCR-Nachweismethoden mit unterschiedlichen Zielgenen empfiehlt, um so ein möglichst hohes Maß an Identifizierungssicherheit zu erlangen.

Neben in der Literatur veröffentlichten Nachweissystemen sind auch kommerzielle Kits zum PCR-Nachweis von *Campylobacter* spp. erhältlich. Das BAX® System Q7 (DuPont Qualicon, USA) kann beispielsweise zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* in Lebensmitteln eingesetzt werden. Bei einer großen Probenzahl kann es aufgrund seiner einfachen Handhabung als schnelle Screeningmethode eingesetzt werden. Williams *et al.* (2008) verglichen in ihrer Studie die BAX® PCR zum Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* mit der kulturellen ISO-Methode (10272:2006) anhand von Geflügelproben und detektierten dabei mit dem BAX® System mehr positive Proben als mit dem kulturellen Verfahren (68% gegenüber 49%). Die Autoren empfehlen das System als effektive Methode, um schnell und zuverlässig *C. jejuni* und *C. coli* in unterschiedlichen Probenarten nachzuweisen.

In neueren Publikationen wurden die etablierten real-time PCR Nachweissysteme bereits auch zur quantitativen Bestimmung der Keimzahlen in den untersuchten Proben eingesetzt (Rudi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Wolffs *et al.*, 2005; Debretson *et al.*, 2006; Wolffs *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Rönner und Lindmark, 2007). Anhand von Standardreihen bekannter Keimkonzentrationen konnten die Keimzahlen in Spülflüssigkeiten von Hähnchenkarkassen oder Zäkumproben ohne Anreicherungsschritt direkt bestimmt werden.

3.3.2. Methoden zur Genotypisierung

Ein guter Überblick über Anwendungen genotypischer Verfahren zur Charakterisierung von *Campylobacter* spp. ist bei Wassenaar und Newell (2000) sowie bei Newell *et al.* (2000) gegeben.

Beim **Ribotyping** werden Mikroorganismen auf Gattungs-, Spezies- oder Stammspezifischer Ebene mittels Nukleinsäuresonden genotypisch charakterisiert. Für die Identifizierung von *Campylobacter* spp. werden meist markierte DNA-Sonden eingesetzt, die aus Sequenzen der 16S rRNA-Gene abgeleitet wurden. Nach der Restriktion der Zielsequenzen mit entsprechenden Endonukleasen können definierte Fragmente mit der markierten Sonde zum Beispiel durch eine Southern-Blot-Hybridisierung bestimmt werden (Schulze *et al.*, 2000). Da *Campylobacter* spp. nur drei Kopien der ribosomalen Gene auf ihrem Chromosom tragen, ist die diskriminatorische Fähigkeit der Methode begrenzt (Wassenaar und Newell, 2000). Dennoch wurde die Technik erfolgreich zur Unterscheidung thermophiler *Campylobacter* spp. eingesetzt (Owen *et al.*, 1993; Stanley *et al.*, 1994; Goossens *et al.*, 1995). Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes der Methode ist sie für den routinemäßigen Einsatz allerdings ungeeignet. Es wurden aber automatisierte Systeme (Riboprinter) entwickelt, die den Aufwand verringern und zudem den Vorteil der Reproduzierbarkeit und somit Standardisierbarkeit mit sich bringen. Das Verfahren des Ribotypings ist jedoch sehr kostenintensiv und ermöglicht nur einen geringen Durchsatz (Wassenaar und Newell, 2000).

Eine weitere Methode zur genotypischen Differenzierung von *Campylobacter* spp. stellt die **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP)** von PCR-Produkten dar. Dabei werden bestimmte PCR-Amplifikate mit Restriktionsenzymen wie beispielsweise *DdeI* geschnitten und es entstehen typische Banden nach Auftrennung auf dem Agarosegel. Es kann entweder auf Spezies- oder durch eine weitere Restriktion mit anderen Endonukleasen (z.B. *AccI*, *AluI* oder *HinII*) auf Stammebene differenziert werden (Schulze *et al.*, 2000; Wassenaar und Newell, 2000). Für *Campylobacter* spp. wurden verschiedene Methoden zur *fla*-Typisierung beschrieben, die bei Wassenaar und Newell (2000) genauer aufgeführt sind. Dieses Gen eignet sich aufgrund seiner konservierten und variablen Regionen zur Typisierung thermophiler *Campylobacter* spp.. Allerdings ist die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Labore durch die unterschiedliche Durchführung der Methode und vor allem durch Verwendung verschiedener Primerpaare und Restriktionsenzyme nicht möglich. Es bedarf daher einer Standardisierung der Methode (Wassenaar und Newell, 2000). Hierfür verglichen Harrington *et al.* (2003) in ihrer Studie im Rahmen eines EU-Projektes (CAMPYNET, <http://campynet.vetinst.dk/>) verschiedene *flaA*-Typisierungsmethoden und schlugen die Methode nach Nachamkin *et al.* (1993 und 1996) aufgrund ihrer guten

diskriminatorischen Fähigkeit und Robustheit zur Standardisierung vor.

Bei der **Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)** wird chromosomale DNA mittels Restriktionsendonukleasen in bestimmte Fragmente geschnitten. Um Scherkräfte, die unerwünschte Brüche erzeugen können, zu vermeiden, werden die Bakterienzellen zur Lyse in ein Agarosegel gebettet. Als Restriktionsenzyme werden so genannte „rare-cut“-Enzyme (z.B. *Sma*I) eingesetzt, um wenige und große Fragmente zu erzeugen. Durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente, bei der das elektrische Feld in pulsierender Weise seine Richtung wechselt, entstehen spezies- bzw. stammspezifische Restriktionsprofile (Newell *et al.*, 2000). Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Typisierbarkeit und Reproduzierbarkeit aus. Sie ist jedoch wesentlich zeit- und arbeitsaufwändiger als die PCR-RFLP-Methode (Schulze *et al.*, 2000). Probleme der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren bestehen auch hier (Wassenaar und Newell, 2000). Erste Anwendungen der Methode zur Typisierung von *C. jejuni* und *C. coli* wurden von Yan *et al.* (1991) und für *C. upsaliensis* von Bourke *et al.* (1996) beschrieben. Neuere Arbeiten stammen von Ioannidis *et al.* (2006), Nebola und Steinhäuserova (2006) sowie Posch *et al.* (2006). Praakle-Amin *et al.* (2007) stellten bei ihrer Untersuchung von *Campylobacter*-Isolaten aus Hähnchen und Truthahn mittels PFGE eine hohe genetische Diversität und einen Zusammenhang zwischen PFGE-Typ und Ursprungsland fest. Lienau *et al.* (2007) nutzten PFGE, um das Auftreten bestimmter Stämme von *Campylobacter* spp. bei Hühnern von der Produktion über die Schlachtung bis zum Einzelhandel zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die während der Aufzucht dominierenden Klone auch im Endprodukt zu finden sind.

Bei der **Random Amplification of polymorphic DNA (RAPD)** werden willkürlich gewählte Primer verwendet, um DNA des ganzen Genoms zu amplifizieren. Dabei wird die Stringenz der Primer und somit die Anzahl und die Größe der Fragmente durch die Annealingtemperatur kontrolliert. Theoretisch ermöglicht diese Methode eine hohe Typisierbarkeit durch die Entstehung spezifischer Bandenmuster. Allerdings sind die Muster aufgrund von unterschiedlich starken Banden schwer zu interpretieren. Zudem kann eine Kontamination mit DNasen zu unspezifischen Fragmenten und somit zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen. Die schlechte Reproduzierbarkeit stellt somit einen großen Nachteil der schnellen und kostengünstigen Methode dar (Wassenaar und Newell, 2000).

Die **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**-Analyse basiert auf dem vollständigen Verdau chromosomaler DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen und der anschließenden Amplifizierung der Produkte. Dabei binden die Primer an die erzeugten Restriktionsstellen und es werden nur Abschnitte amplifiziert, die von beiden Restriktionsstellen eingegrenzt sind. Die entstehenden Amplifikate können durch Fluoreszenzmarkierung der Primer mithilfe eines Sequenziergerätes analysiert werden. Dabei kommt es zur Unterscheidung von Fragmenten mit einer Länge zwischen 50 und 500 Nukleotiden. Diese

Technik zeichnet sich wie die PFGE durch eine hohe diskriminatorische Fähigkeit aus. AFLP-Methoden zur Typisierung von *C. jejuni* und *C. coli* wurden erstmals von Duim *et al.* (1999) und Kokotovic und On (1999) veröffentlicht. Mittlerweile ist eine Reihe von Publikationen erschienen, die diese Technik zur Genotypisierung thermophiler *Campylobacter* spp. einsetzen. Duim *et al.* (2004) untersuchten damit Stämme von *C. lari* auf genotypische Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen phänotypischen Varianten. Siemer *et al.* (2004) analysierten mit der AFLP-Analytik Stämme von *C. coli* bei Schweinen und Geflügel und konnten die verschiedenen Isolate beim Geflügel als Quelle für menschliche Infektionen identifizieren. Auch Gürtler *et al.* (2005), Fang *et al.* (2006), Johnsen *et al.* (2006 und 2007), Keller *et al.* (2007) und Waldenström *et al.* (2007) nutzten die Methode für epidemiologische Studien über die Verbreitung von *Campylobacter* spp..

Eine weitere, neuere molekularbiologische Technik zur genotypischen Charakterisierung von Bakterien ist das **Multilocus Sequence Typing (MLST)**. Dabei werden DNA-Fragmente von in der Regel sieben verschiedener Housekeeping-Gene sequenziert. Die Fragmente sind zwischen 450 und 500 Basenpaaren lang. Den unterschiedlichen Sequenzen bzw. Allelen eines Gens werden Nummern zugeordnet und das Profil der Allele aller sieben Gene ergibt somit den Sequenztyp eines Isolats. Das erste MLST-Schema wurde von Maiden *et al.* (1998) für *Neisseria meningitidis* entwickelt. Der Vorteil dieser Technik ist die hohe diskriminatorische Fähigkeit aufgrund der Unterscheidung einzelner unterschiedlicher Nukleotide und der Untersuchung verschiedener Gene. Housekeeping-Gene sind dennoch relativ stabil hinsichtlich genetischer Veränderungen und erlauben daher eine gute Charakterisierung. Die Etablierung einer globalen Datenbank ermöglicht den internationalen Austausch gewonnener Daten zwischen den Laboren und somit epidemiologische und phylogenetische Studien. Gerade für *Campylobacter* spp., bei denen die Epidemiologie noch weitestgehend unverstanden ist und eine hohe genetische Diversität auftritt, konnte die Methode bereits erfolgreich angewendet werden und eine Datenbank mit über 3500 Isolaten eingerichtet werden (<http://pubmlst.org/campylobacter>). Für die Charakterisierung von *C. jejuni* wurden von Dingle *et al.* (2001) die Loci *aspA* (Aspartase A), *glnA* (Glutaminsynthetase), *gltA* (Citratsynthetase), *glyA* (Serinhydroxymethyltransferase), *pgm* (Phosphoglucomutase), *tkt* (Transketolase) und *uncA* (Untereinheit der ATP Synthase) gewählt. Bei der Untersuchung von 194 Isolaten von *C. jejuni* unterschiedlichen Ursprungs stellten die Autoren eine hohe genetische Diversität, eine geringe Klonalität und einen häufigen intra- und interspezifischen genetischen Austausch fest. Diese Eigenschaften thermophiler *Campylobacter* spp. wurden auch von anderen Autoren durch Anwendung von MLST beschrieben (Schouls *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2005; Mickan *et al.* 2006; Litrup *et al.*, 2007). Miller *et al.* (2006) konnten zeigen, dass bei Schweinen sehr diverse Stämme auftreten, während bei Rindern sehr klonale Stämme, die zu 83% den gleichen Sequenztyp besitzen,

nachzuweisen sind. Bei Rindern dominieren vor allem drei Serotypen von *C. jejuni*, die auch im Zusammenhang mit menschlichen *Campylobacter*-Infektionen stehen (Kwan *et al.*, 2008), während bei Isolaten von *C. coli* aus Mensch und Schwein nur eine geringe Übereinstimmung auftritt und Schweine somit kaum als Kontaminationsquelle für Menschen anzusehen sind (Littrup *et al.*, 2007). Bei *C. jejuni*-Isolaten aus Geflügel treten wiederum gleiche Sequenztypen wie beim Menschen auf, was auf eine gemeinsame Quelle hinweist (Rodin *et al.*, 2008). In einzelnen Studien wurde die MLST-Analytik mit anderen Methoden zur Genotypisierung von *Campylobacter* spp. verglichen. Sails *et al.* (2003) und Rodin *et al.* (2008) beschreiben eine geringere diskriminatorische Fähigkeit von MLST im Vergleich zu PFGE. Djordjevic *et al.* (2007) sehen in der *flaA* RLFP-Analyse eine günstige Alternative zu MLST mit annähernd gleich hoher Auflösungsfähigkeit.

Insgesamt betrachtet zeigen die Untersuchungen mit den verschiedenen Methoden zur genotypischen Charakterisierung von *Campylobacter* spp. alle die hohe genetische Diversität dieser Gattung auf. Daher erscheint die Kombination zweier Methoden bzw. die Kombination von Genotypisierung mit Serotypisierung sinnvoll, um eine zuverlässige Charakterisierung zu ermöglichen.

C. Material und Methoden

1. Material

1.1. Untersuchungsmaterial

1.1.1. Referenzstämme

Als Referenzstämme zur Etablierung der Quadruplex real-time PCR und als Positivkontrollen dienten *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947. Weitere Bakterienstämme, die für Selektivitätsprüfungen und zur DNA-Sequenzierung eingesetzt wurden, sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Verwendete Referenzstämme

Spezies	Stamm	Stammsammlung
<i>C. jejuni</i>	4688	DSMZ ¹⁾
<i>C. coli</i>	4689	DSMZ
<i>C. lari</i>	E6	GSF ²⁾
<i>C. lari</i>	E7	GSF
<i>C. lari</i>	19512	CCUG ³⁾
<i>C. lari</i>	23947	CCUG
<i>C. lari</i>	18294	CCUG
<i>C. upsaliensis</i>	14913	CCUG
<i>C. fetus</i>	5361	DSMZ
<i>C. helveticus</i>	33880	CCUG
<i>C. concisus</i>	19996	CCUG
<i>C. hyoilei</i>	33450	CCUG
<i>C. hyoilei</i>	33769	CCUG
<i>C. hyoilei</i>	34482	CCUG
<i>C. sputorum</i>	37580	CCUG
<i>C. curvus</i>	13146	CCUG

¹⁾ Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

²⁾ Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

³⁾ Culture Collection University of Göteborg, Schweden

1.1.2. Referenz-DNA

Es wurde sowohl für die Untersuchungen der Selektivität der Quadruplex real-time PCR als auch für die DNA-Sequenzierung eines Abschnittes des Gyrase-Gens von *C. lari* bereits extrahierte DNA, die von anderen Forschungseinrichtungen (z.B. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) bezogen wurde, eingesetzt. Dabei handelte es sich um DNA-Extrakte aus Stämmen aus offiziellen Stammsammlungen (DSMZ und ATCC) oder aus gut charakterisierten Isolaten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten DNA-Proben.

Tabelle 4: Verwendete DNA-Extrakte

Spezies	Stamm	Herkunft / Stammsammlung
<i>C. jejuni</i>	3641	BfR ¹⁾
<i>C. jejuni</i>	3642	BfR
<i>C. jejuni</i>	760	BfR
<i>C. jejuni</i>	3742	BfR
<i>C. jejuni</i>	Zierske	BfR
<i>C. jejuni</i>	Gina	BfR
<i>C. jejuni</i>	Fara	BfR
<i>C. jejuni</i>	Ilse	BfR
<i>C. jejuni</i>	3072	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 7181	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 6966	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 6965	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 7182	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 7408	BfR
<i>C. jejuni</i>	L 6436	BfR
<i>C. jejuni</i>	L5095/1	BfR
<i>C. jejuni</i>	RM1221 / 4600	ATCC ²⁾
<i>C. coli</i>	3629	BfR
<i>C. coli</i>	3644	BfR
<i>C. coli</i>	2033	BfR
<i>C. coli</i>	1818	BfR
<i>C. coli</i>	3741	BfR
<i>C. coli</i>	L 6757	BfR
<i>C. coli</i>	CI 68	BfR
<i>C. lari</i>	11375	DSMZ ³⁾
<i>C. lari</i>	2910	BfR
<i>C. lari</i>	72	BfR
<i>C. lari</i>	156	BfR
<i>C. lari</i>	1745	BfR
<i>C. lari</i>	1807	BfR
<i>C. lari</i>	L 2979	BfR
<i>C. lari</i>	L1880/1	BfR
<i>C. lari</i>	L1880/2	BfR
<i>C. fetus</i>	930075	BfR

MATERIAL UND METHODEN

<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	473/99	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	BS 213/02	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	484/99	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	454/99	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	325/99	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	03/04	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	BS 09/06	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	1801	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	99/03	BfR
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	BS 75/04	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	5365	DSMZ
<i>C. upsaliensis</i>	14	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	982080	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	9734968	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	9922790	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	993086	BfR
<i>C. upsaliensis</i>	U Ir 3	BfR
<i>C. hyointestinalis</i>	BS 102/05	BfR
<i>C. hyointestinalis</i>	R 523 I	BfR
<i>C. hyointestinalis</i>	R 525 I	BfR
<i>C. helveticus</i>	k.3.1.	BfR
<i>Arcobacter butzleri</i>	8739	DSMZ
<i>Arcobacter skirowii</i>	7302	DSMZ
<i>Arcobacter cryoaerophilus</i>	7289	DSMZ
<i>Arcobacter cibarius</i>	17680	DSMZ
<i>Helicobacter pylori</i>	26696	DSMZ
<i>Bacillus cereus</i>	4312	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i>		Merck Sporensuspension
<i>Citrobacter freundii</i>	30039	DSMZ
<i>Clostridium botulinum</i>	Typ A REB 1750	NRZ TLLV ⁵⁾
<i>Clostridium botulinum</i>	Typ B REB 1944	NRZ TLLV
<i>Clostridium botulinum</i>	Typ F REB 1718	NRZ TLLV
<i>Clostridium botulinum</i>	Typ E REB 1955	NRZ TLLV
<i>Clostridium perfringens</i>	756	DSMZ
<i>E. coli</i>	301	DSMZ
<i>E. coli</i> O157	Feldstamm 786/02	LGL
<i>E. coli</i> K12	498	DSMZ
<i>Edwardsiella tarda</i>	30052	DSMZ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	PE 276	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Enterobacter cloacae</i>	30054	DSMZ
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4485	DSMZ
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	ATCC
<i>Hafnia alvei</i>	30163	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	ATCC
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Feldstamm 431/99	LGL ⁴⁾
<i>Listeria monocytogenes</i>	20600	DSMZ

MATERIAL UND METHODEN

<i>Proteus mirabilis</i>	788	DSMZ
<i>Proteus vulgaris</i>	PE 502	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	117/TBK	DSMZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Feldstamm 891/02	LGL
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Feldstamm 374/03	LGL
<i>Salmonella</i> Cerro	Feldstamm 728/02	LGL
<i>Salmonella</i> Paratyphi	Feldstamm 156/03	LGL
<i>Salmonella</i> Virchow	Feldstamm 168/04	LGL
<i>Serratia marcescens</i>	30121	DSMZ
<i>Shigella boydii</i>	PE 53	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella dysenteriae</i>	PE 50	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Shigella flexneri</i>	4782	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg / DSMZ
<i>Shigella sonnei</i>	PE 53	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Vibrio cholerae</i>	Feldstamm 87/01	LGL
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11058	DSMZ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4780	DSMZ
<i>Yersinia intermedia</i>	PE 274	GeneScan Analytics GmbH, Freiburg
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	8992	DSMZ

¹⁾ Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

²⁾ American Type Culture Collection, USA

³⁾ Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

⁴⁾ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

⁵⁾ Nationales Referenzzentrum für Clostridien am Thüringer Landesamt für
Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Erfurt

1.1.3. Probenmaterial

Zur Untersuchung von artifiziell kontaminierten Lebensmitteln wurde für Spiking-Versuche mit *C. jejuni* und *C. coli* frisches Hackfleisch und für Spiking-Versuche mit *C. lari* frisches Seelachsfilet aus der Theke eines Supermarktes verwendet. Bei den Produkten wurde am Tag des Einkaufs eine Teilprobe zur Überprüfung der Abwesenheit von *Campylobacter* spp. angereichert. Die restliche Probe wurde zwei Tage im Kühlschrank bei 4°C bis zur Durchführung der artifiziellen Kontamination mit *Campylobacter* spp. gelagert.

Bei den zur Validierung der Quadruplex real-time PCR eingesetzten Lebensmittelproben aus der Routineanalytik des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) handelte es sich hauptsächlich um Geflügelproben. Probenmaterial waren vor allem Hähnchenschenkel, Entenbrust und Putenkeulen. Außerdem wurden Muscheln, Fisch, Schweine- und Rindfleisch und Blattsalat untersucht. Die Proben stammten in erster Linie aus dem bayerischen Einzelhandel (Supermärkte, Metzgereien). In geringerem Umfang wurden auch Proben aus dem Großhandel, vom Erzeuger, aus der Gastronomie oder von Wochenmärkten untersucht. Die Proben waren mit wenigen Ausnahmen roh und entweder frisch oder tief gefroren. Der Probenansatz erfolgte entweder am Tag der Probenlieferung oder am darauf folgenden Vormittag.

1.2. Nährmedien

Medium	Komponente (Hersteller, Nummer)	Menge
Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon	• Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, CM0067)	25 g
	• <i>Campylobacter</i> -Anreicherungs-Supplement (Oxoid, SR0084E)	2 Fläschchen
	• <i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement (Oxoid, SR0069E)	2 Fläschchen
	• CCDA-Selektiv-Supplement (Oxoid, SR0155E)	2 Fläschchen
	• Pferdeblut lysiert (Oxoid, SR0048C)	5%
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Hirn-Herz-Bouillon	• Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225)	37 g
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Blutagar	• Blutagar-Basis (Oxoid, CM0055)	40 g
	• Schafblut defibriniert (Oxoid, SR0051E)	100 ml
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Columbia-Agar selektiv	• Columbia-Agar-Basis (Oxoid, CM0331)	39 g
	• <i>Campylobacter</i> -Anreicherungs-Supplement (Oxoid, SR0084E)	2 Fläschchen
	• <i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement (Oxoid, SR0069E)	2 Fläschchen
	• Pferdeblut lysiert (Oxoid, SR0048C)	50 ml
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
<i>Campylobacter</i> -Selektiv-agar mit CAT-Supplement	• <i>Campylobacter</i> -Agar-Basis, blutfrei (Oxoid, CM0739)	22,75 g
	• <i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement (CAT) (Oxoid, SR0174)	2 Fläschchen
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Plate-Count-Agar	• Plate-Count-Agar (Merck, 1.05463)	23,5 g
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Baird-Parker-Agar	• Baird-Parker-Agar (Merck, 1.05406)	58 g
	• Eigelb-Tellurit Emulsion (Merck, 1.03785)	50 ml
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Rapid <i>E. coli</i> Agar (REC)	• Rapid <i>E. coli</i> 2 Agar (Bio Rad, 3564024)	37 g
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Pseudomonas-Aeromonas-Selektivagar (GSP)	• GSP-Agar (Merck, 1.10230)	45 g
	• Pimaricin (Calbiochem, 52796)	0,8 ml
	• Penicillin (Grünenthal)	1 Prise
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Lactobacillus Agar (MRS)	• MRS-Agar (Oxoid, CM 361)	62 g
	• Kaliumsorbat (13,3%) (Fluka, 85520)	10 ml
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml

MATERIAL UND METHODEN

Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBD)	<ul style="list-style-type: none"> • VRBD-Agar (Merck, 1.10275) • Aqua dest 	<p>39,95 g Ad 1000 ml</p>
Hefextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC)	<ul style="list-style-type: none"> • YGC-Agar (Merck, 1.16000) • Aqua dest 	<p>40 g Ad 1000 ml</p>
Schokoladen-Agar mit Vitox	<ul style="list-style-type: none"> • Fertige Platten (Oxoid, PO5090A) 	

1.3. Gebrauchslösungen

Lösung	Komponente (Hersteller, Nummer)	Menge
PBS-Puffer (pH = 7,5)	• Natriumchlorid (Merck, 1.06404)	8,5 g
	• Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, 1.06580)	0,5 g
	• Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, 1.04873)	1,14 g
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
Verdünnungsflüssigkeit mit 0,4% Agar	• Natriumchlorid (Merck, 1.06404)	8,5 g
	• Pepton aus Casein (pankreatisch) (Merck, 1.07213)	1,0 g
	• Agar Agar (Merck, 1.01614)	0,4 g
	• Aqua dest.	Ad 1000 ml
0,1x TE-Puffer	• Tris-EDTA Buffer Solution 100x (Sigma, T9285)	0,1ml
	• Aqua dest.	99,9 ml

1.4. Gebrauchsmaterial

Gerät (Typ-Bezeichnung)	Hersteller
CO ₂ -Brutschrank Hera plus	Heraeus Instruments
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments
Ultrospec 3000 UV / Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
Schüttler IKA® MS1 Minishaker und IKA® lab dancer	Janke & Kunkel, Deutschland)
Stomacher Lab-Blender 400	Kleinfeld Labortechnik
MiniVIDAS®	BioMérieux
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich
Tischzentrifuge Costar®	neoLab®
96-Well-Platten-Zentrifuge Universal 16R	Hettich
Thermomixer eppendorf comfort	Eppendorf
Heizblock für BAX® System	DuPont Qualicon

MATERIAL UND METHODEN

Kühlblock für BAX [®] System	DuPont Qualicon
Pipettierautomat Sequentia [®]	Kiestra Instrumentmakers
Spiral Plater Eddy Jet	IUL Instruments
CounterMat Flash und Software CounterMat 4.2	IUL Instruments
Anaerobentopf 2,5 l und 3,5 l	Oxoid
Pipetten eppendorf Reference (10, 20, 100 und 1000 µl)	Eppendorf
Pipette eppendorf Multipette [®] plus	Eppendorf
Pipette eppendorf Varispenser [®] plus	Eppendorf
Pipetten Finnpipette [®] Digital (5-50 µl, 20-200 µl und MCP 5-50 µl)	Thermo
Pipette Finnpipette [®] Stepper	Thermo
Lichtmikroskop Leica DMLP	Leica
Sequenziergerät 310 Genetic Analyzer und Software	ABI PRISM [™]
Lasergene Software	DNASTAR
2100 Bioanalyzer und Software 2100 expert	Agilent
Real-time Cyler Mx3000P und Software MxPro	Stratagene
Identifizierungssoftware api [®]	BioMérieux
Genedoc (Version 2.6.02)	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html
BAX [®] Thermocycler mit integriertem Nachweissystem und Software Launch BAX [®] System Q7	DuPont / Applied Biosystems
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf
Thermocycler Primus 96 plus	MWG Biotech

1.5. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller und Nummer
Gaserzeugende Systeme AnaeroGen 2,5 l und 3,5 l	Oxoid, AN0025A und AN0035A
Gaserzeugende Systeme CampyGen 2,5 l und 3,5 l	Oxoid, CN0025A und CN0035A
Kryoröhrchen	Greiner, 121279
Pipettenspitzen ep T.I.P.S filter PCR clean 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Eppendorf, 0030 007.040, 0030 007.067 und 0030 007.105
Pipettenspitzen Combitips plus, 0,2 ml	Eppendorf, 0030 069.412
Pipettenspitzen Finntip [®] 50 und 250 Univ.	Thermo, 9400 370 und 9400 260
Pipettenspitzen Finntip [®] Stepper 5,0 ml	Thermo, 9404 200
Reagenzgefäße eppendorf Safe-Lock-Tube 2,0 ml, 1,5 ml und 0,5 ml	Eppendorf, 0030 120.094, 0030 121.848 und 0030 121.708
Reagenzgefäße für BAX [®] System	DuPont Qualicon
Sequencer Sample Tubes	Applied Biosystems, 401957
Sequencer Septa for Sample Tubes	Applied Biosystems, 401956

VIDAS® <i>Campylobacter</i> Testkit	BioMérieux, 30111
Filter, Minisart® 0,65 µm	Sartorius AG, 16569
Spritzen, Syringes 3 ml	Becton Dickinson Labware, 300910
Dryspot <i>Campylobacter</i> -Test	Oxoid, DR0150
api® Campy	bioMérieux, 20800
H ₂ O, PCR grade	Invitrogen, 750024
H ₂ O, HPLC grade	Promochem, SO-6795-BO25
10x PCR Buffer (enthält 15 mM MgCl ₂)	Qiagen, 203203
HotStar Taq DNA Polymerase (5 units/µl)	Qiagen, 203203
MgCl ₂ (25mM)	Qiagen, 203203
GeneAmp dNTPs	Applied Biosystems, N808-0007
Amplitaq® DNA-Polymerase with GeneAmp 10x PCR Buffer	Applied Biosystems, N808-0167
Agilent DNA 1000 Reagents mit Chips	Agilent, 50671504
QIAquick® Purification Kit	Qiagen, 28106
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, 8042.2
Natriumacetat Puffer (3M)	Sigma, S-7899
Ethanol absolut	BDH AnalaR, 10107
BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, 4336774
Dimethylsulfoxid	Fluka, 41639
DNA-Natriumsalz aus Kalbsthymus	Sigma, D3664-5X1MG
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, 4304437
QuantiTect Multiplex PCR Master Mix	Qiagen, 204545
Primer	Tib Molbiol
TaqMan®-Sonden	Tib Molbiol
96-Well-Optical Reaction Plate	Applied Biosystems, 4306737
ABI PRISM™ Optical Adhesive Cover Starter Kit	Applied Biosystems, 4313663
Testkit BAX® System Real-Time PCR Assay <i>Campylobacter jejuni, coli und lari</i>	Oxoid, QB3449C

2. Methoden

2.1. Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.1.1. Anzucht und Lagerung von Referenzstämmen von *Campylobacter* spp.

Die Stämme *C. jejuni* DSMZ 4688 und *C. coli* DSMZ 4689 wurden als Referenzstämmen eingesetzt und auf Blutagarplatten einmal wöchentlich subkultiviert und zwischenzeitlich bei 4°C aufbewahrt. Es wurden weitere Stämme von *Campylobacter* spp., die zur Überprüfung der Selektivität der etablierten real-time PCR eingesetzt wurden, von einer schwedischen Stammsammlung (siehe 1.1.1) bezogen. Die Lyophilisate dieser Stämme wurden zunächst in Herz-Hirn-Bouillon aufgelöst. Mit der Suspension wurden verschiedene Agarplatten

(Blutagar, Schokoladenagar, Columbia-Agar selektiv, *Campylobacter* Selektiv-Agar mit CAT-Supplement) beimpft. Es wurden sowohl die Suspension als auch die Agarplatten bei entsprechenden Temperaturen und in empfohlener Gasatmosphäre für mindestens 48 Stunden bebrütet. Die einzelnen Bedingungen, bei denen die verschiedenen Stämme angezüchtet wurden, sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Nach erfolgreicher Anzucht und DNA-Extraktion wurden alle Stämme bei -80°C kryokonserviert gelagert. Der Stamm *C. lari* CCUG 23947 wurde für den gesamten Verlauf der Arbeit zusammen mit *C. jejuni* DSMZ 4688 und *C. coli* DSMZ 4689 als Referenzstamm mitgeführt.

Tabelle 5 Anzuchtbedingungen verschiedener Stämme von *Campylobacter* spp.

Stamm	Temperatur (°C)	Gasatmosphäre	Agar (Zusammensetzung siehe 1.2)
<i>C. lari</i> CCUG 23947	37	mikroaerob	Blutagar
<i>C. lari</i> CCUG 19512	37	mikroaerob	Blutagar
<i>C. lari</i> CCUG 18294	37	mikroaerob	Blutagar, Columbia-Agar selektiv und Schokoladenagar
<i>C. upsaliensis</i> CCUG 14913 T	37	mikroaerob	Blutagar
<i>C. hyoilei</i> CCUG 33450 T	37	mikroaerob	Blutagar
<i>C. hyoilei</i> CCUG 33769 A	37	mikroaerob	Schokoladenagar
<i>C. hyoilei</i> CCUG 34482	37	mikroaerob	Blutagar, Columbia-Agar selektiv und Schokoladenagar
<i>C. sputorum</i> CCUG 37580	37	mikroaerob	Schokoladenagar
<i>C. helveticus</i> CCUG 33880	37	mikroaerob	Blutagar, Columbia-Agar selektiv, Schokoladenagar und <i>Campylobacter</i> -Agar selektiv (CAT)
<i>C. concisus</i> CCUG 19996	37	anaerob	Blutagar, Columbia-Agar selektiv, Schokoladenagar und <i>Campylobacter</i> -Agar selektiv (CAT)*
<i>C. curvus</i> CCUG 13146	37	anaerob	Blutagar, Columbia-Agar selektiv, Schokoladenagar und <i>Campylobacter</i> -Agar selektiv (CAT)*

* Anzucht auf Agarplatte erst nach Bebrütung und Ausstrich der Herz-Hirn-Bouillon möglich

2.1.2. Bestimmung des Keimgehaltes einer Bakteriensuspension

Die Ermittlung des Keimgehaltes von Bakteriensuspensionen diente zum einen dazu, die Nachweisgrenze der etablierten real-time PCR in koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml

nach Voranreicherung zu bestimmen und zum anderen dazu, eine definierte Keimzahl für die artifizielle Kontamination von Probenmaterial einzusetzen. Für die Versuche wurde jeweils Koloniematerial der Referenzstämme von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* (siehe 2.1.1) in ca. 50 ml Prestonbouillon für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank (5% O₂, 9% CO₂, 86% N₂) bei 42°C angereichert. Anschließend wurden dezimale Verdünnungsreihen der Ausgangssuspension bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁹ erstellt. Von den Stufen 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁷ und 10⁻⁹ wurden mit dem Spiral Plater Eddy Jet jeweils 50 µl auf Blutagar im Doppelansatz ausspiralisiert und für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 42°C bebrütet. Die Keimzahl in der Ausgangssuspension in KbE/ml wurde durch Auswertung der bakteriell bewachsenen Agarplatten mit dem Keimzahlbestimmungsgerät CounterMat ermittelt.

2.1.3. Bestimmung der Hintergrundflora in Lebensmitteln

Um den mikrobiologischen Zustand der Proben, die für die Versuche zur artifiziellen Kontamination eingesetzt wurden, beurteilen zu können, wurde die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl sowie das Vorhandensein verschiedener Indikatorkeime und Hefen bestimmt. Dazu wurden 10 g der Probe zu 90 ml Verdünnungsflüssigkeit gegeben und im Stomacher für zwei Minuten (Frequenz: 8 stokes/sec) inkubiert. Aus der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10⁻³ erstellt. Von den Stufen 10⁻¹ und 10⁻³ wurden mit dem Spiral Plater Eddy Jet jeweils 50 µl auf den entsprechenden Agarplatten im Doppelansatz ausspiralisiert und bebrütet. Die verschiedenen Parameter mit ihren Inkubationsbedingungen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Nach der Bebrütung der Agarplatten wurde anhand der Verdünnungsstufe, bei der die Kolonien am besten zählbar waren, die Keimzahl in der Ausgangssuspension in KbE/ml bestimmt.

Tabelle 6 Anzuchtbedingungen zur Bestimmung der Hintergrundflora in Lebensmitteln

Nachweis von	Agar (Zusammensetzung siehe 1.2)	Temperatur / Gasatmosphäre	Bebrütungsdauer
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	Plate Count	30°C / aerob	3 Tage
Koagulase-positive Staphylokokken	Baird Parker	37°C / aerob	2 Tage
Coliforme Keime	REC	37°C / aerob	1 Tag
<i>E. coli</i>	REC	45°C / aerob	1 Tag
Pseudomonaden	GSP	30°C / aerob	3 Tage
Säuretolerante Laktobazillen	MRS	25°C / aerob	3 Tage
<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBD	30°C / anaerob	2 Tage
Hefen	YGC	25°C / aerob	5 Tage

2.1.4. Artificielle Kontamination von Probenmaterial

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der etablierten real-time PCR in Anzahl der nachweisbaren Keime pro 25 g Lebensmittel wurde Probenmaterial artifiziell kontaminiert. Dabei wurde Probenmaterial ausgewählt, bei dem eine natürliche Kontamination mit den entsprechenden *Campylobacter* Spezies vorkommen kann, jedoch eher unwahrscheinlich ist und im tatsächlich eingesetzten Material vorab ausgeschlossen wurde, um von *Campylobacter*-freiem Material auszugehen. Für die Versuche mit *C. jejuni* und *C. coli* wurde Hackfleisch und für *C. lari* Seelachsfilet gewählt. Die Proben wurden jeweils frisch aus der Theke eines Supermarktes bezogen und zunächst mittels Quadruplex real-time PCR (Voranreicherung und Protokoll siehe 2.1.5 und 2.6.3) auf die Abwesenheit von *Campylobacter* spp. untersucht. Bis zum Erhalt des Ergebnisses zwei Tage später wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Dadurch wurde auch die Entwicklung einer normalen mikrobiellen Hintergrundflora bewirkt, um möglichst authentische Ausgangsbedingungen für die artificielle Kontamination mit *Campylobacter* spp. zu schaffen. Die Bestimmung der mesophilen Gesamtkeimzahl und anderer Indikatorkeime erfolgte wie unter 2.1.3 beschrieben. Für die artificielle Kontamination wurden je 25 g Probenmaterial mit definierten Keimzahlen von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* beimpft. Dabei wurde aufgrund von Erfahrungswerten davon ausgegangen, dass in einer angereicherten Bakteriensuspension von *Campylobacter* spp. durchschnittlich eine Keimzahl von 5×10^8 KbE/ml vorliegt. Es wurden pro Versuch jeweils drei Proben mit mutmaßlich 0-1 KbE/25 g, 1-5 KbE/25 g und 5-10 KbE/25 g beimpft. Die tatsächliche Keimzahl wurde im Nachhinein wie unter 2.1.2 beschrieben bestimmt. Pro Kontaminationsstufe wurde eine Probe zusätzlich zu dem zu testenden Keim (*C. jejuni*, *C. coli* oder *C. lari*) mit je ca. 100 KbE/25 g der beiden anderen *Campylobacter* Spezies beimpft, um die Nachweisgrenze der jeweiligen Spezies auch bei hoher Hintergrundflora der beiden anderen Spezies zu determinieren. Pro Versuch wurden jeweils eine Positivkontrolle mit ca. 100 KbE des zu testenden Referenzstammes pro 25 g Probe sowie eine Negativkontrolle ohne Zugabe einer Keimsuspension mitgeführt.

2.1.5. Kulturelle Voranreicherung von Lebensmitteln zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

Zur kulturellen Voranreicherung wurden 25 g der in Stücke geschnittenen Lebensmittelprobe in 225 ml Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon gegeben. Bei Geflügelfleisch wurde vor allem Haut untersucht. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Brutschrank bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen für 48 Stunden. Daran schloss sich der weitere kulturelle Nachweis an. Der Nachweis mittels real-time PCR wurde ebenfalls nach 48 Stunden Voranreicherung durchgeführt. Bei einem Teil der Proben wurde zusätzlich auch bereits

nach 24 Stunden Bebrütung ein Aliquot aus der Voranreicherung für die molekularbiologische Untersuchung entnommen.

2.1.6. Keimisolierung und konventionelle Bestätigungsverfahren bei *Campylobacter*-positiven Lebensmittelproben

Die bakteriellen Voranreicherungen der Lebensmittelproben wurden zunächst einem Screening durch Anwendung eines enzymgebundenen Fluoreszenzassay (MiniVIDAS[®], BioMérieux) unterzogen, um negative Proben von der weiteren Analyse ausschließen zu können. Zur Isolierung der Keime aus *Campylobacter*-positiven Proben wurde nach Aufschütteln der bebrüteten Anreicherungsbouillon ca. 1 ml durch ein steriles 0,65 µm Membranfiltersystem filtriert. Daraus erfolgte eine Subkultivierung auf Blutagar mittels 3-Ösen-Ausstrich. Die Agarplatten wurden im CO₂-Brutschrank bei 42°C 48 Stunden bebrütet. Nach der Bebrütung der Blutplatten wurden von verdächtigen Kolonien Nativpräparate erstellt und im Interferenzphasenmikroskop beurteilt. Die Keime wurden als *Campylobacter* spp. beurteilt, wenn die charakteristische, gebogene Form und korkenzieherartige Bewegungen zu beobachten waren. Zur weiteren Bestätigung der Isolate wurde ein Latex-schnellagglutinationstest (Dryspot *Campylobacter*-Test, Oxoid) durchgeführt. Dieser Agglutinationstest beruht auf dem Nachweis von *Campylobacter* spp. durch Reaktion der Oberflächenantigene der Keime mit an Latexpartikel gebundenen Anti-*Campylobacter*-Kaninchen-Antikörpern. Der Test erfasst *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*.

Die Bestimmung der Isolate auf Spezies-Ebene erfolgte mittels eines Testkits (api[®] Campy, BioMérieux) zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. aufgrund der unterschiedlichen biochemischen Reaktionen der einzelnen Spezies. Bei diesem Test wird die Spezies bzw. Subspezies auf der Basis der Einzelergebnisse der verschiedenen Stoffwechselreaktionen mittels zugehöriger Identifizierungssoftware bestimmt.

2.2. Extraktion von DNA aus Bakterienisolaten und Lebensmittelanreicherungen zum Nachweis mittels PCR

Zur Extraktion von DNA aus Proben für den Nachweis mittels PCR wurden je nach Probenart und Nachweissystem unterschiedliche Protokolle angewendet, die in diesem Abschnitt beschrieben sind.

2.2.1. Proben für die Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR und der 16S rDNA PCR

Bakterienisolate:

1. Mit Öse wenig Material einer Kolonie in 300 µl 0,1 x TE-Puffer einreiben
2. 15 min bei 95°C kochen
3. 3 min bei 4°C und 14000 x g zentrifugieren
4. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und bis zum Einsatz in der PCR im Kühlschrank aufbewahren

Voranreicherungen von Lebensmittelproben:

1. 1 ml aus Anreicherung entnehmen
2. 5 min bei 10000 x g zentrifugieren
3. Überstand abnehmen und verwerfen
4. Pellet in 500 µl 1 x PBS-Puffer resuspendieren
5. 5 min bei 10000 x g zentrifugieren (Waschschritt)
6. Überstand abnehmen und verwerfen
7. Pellet in 300 µl 0,1x TE-Puffer resuspendieren
8. 15 min bei 95°C kochen
9. 3 min bei 4°C und 14000 x g zentrifugieren
10. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und bis zum Einsatz in der PCR bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren

2.2.2. Proben für die Untersuchung mit dem BAX[®] System (DuPont)

Bei den Proben für die Untersuchung mit dem BAX[®] System wurde die DNA entsprechend den nachfolgend beschriebenen Herstellerangaben extrahiert.

Bakterienisolate:

1. Einreiben einer Impfüse des zu untersuchenden Isolates in 0,3 ml Hirn-Herz-Bouillon
2. Überpipettieren von 5 µl in das Lysereagenz
3. Inkubation in Thermoblock 1 für 20 min bei 37°C
4. Inkubation in Thermoblock 2 für 10 min bei 95°C
5. Abkühlen der Reaktionsgefäße im Kühlblock für 5 min

Voranreicherungen von Lebensmittelproben:

1. Überpipettieren von 5 µl aus der bakteriellen Voranreicherung in das Lysereagenz
2. Inkubation in Thermoblock 1 für 20 min bei 37°C
3. Inkubation in Thermoblock 2 für 10 min bei 95°C
4. Abkühlen der Reaktionsgefäße im Kühlblock für 5 min

2.3. Nachweis der 16S rDNA von Bakterien mittels konventioneller PCR

Zum allgemeinen Nachweis bakterieller DNA wurde eine konventionelle PCR durchgeführt, bei der die ersten 800 Basenpaare der 16S rDNA von Bakterien amplifiziert werden. Der mit diesen Primern amplifizierte Bereich der 16S rDNA kann durch Sequenzierung zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt werden.

Die Primersequenzen, die Zusammensetzung des Mastermixes und das Zeit- und Temperaturprofil zur Durchführung der PCR sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 7 Primer für allgemeinen Nachweis der 16S rDNA von Bakterien

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')
Primer fD1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
Primer 800r	GAG TAC CAG GGT ATC TAA TCC

Tabelle 8 Zusammensetzung des Mastermixes für den allgemeinen Nachweis der 16S rDNA von Bakterien

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
GeneAmp 10x PCR Buffer (Applied Biosystems)	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5
dNTPs (2,5 mM each)	0,05 mM	0,5
Amplitaq® DNA-Polymerase (5 U/µl) (Applied Biosystems)	0,5 U	0,1
Primer fD1 (10 µM)	400 nM	1
Primer 800r (10 µM)	400 nM	1
Aqua dest		12,4
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 9 Temperatur- und Zeitprofil für PCR zum allgemeinen Nachweis der 16S rDNA von Bakterien

Programmschritt		Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung / Aktivierung der Polymerase		98°C	2 min	-
Zyklus- phase	Denaturierung	94°C	30 sec	41 x
	Annealing	55°C	30 sec	
	Extension	72°C	1:30 min	
Extension		72°C	7 min	-

2.4. Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung bestimmter DNA-Sequenzen wurden jeweils 100 µl PCR-Produkt des zu untersuchenden DNA-Abschnittes eines Bakterien-Stammes hergestellt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Bioanalyzer (Agilent), einer LabChip™-Technologie zur automatisierten elektrophoretischen Analyse von Nukleinsäuren, hinsichtlich der richtigen Größe (bp) überprüft, bevor es für die Sequenzierung aufgereinigt wurde.

Der Aufreinigungsschritt dient dazu, Komponenten des Mastermixes der PCR-Reaktion zu entfernen, bevor das PCR-Produkt in die Sequenzier-PCR eingesetzt wird. Hierfür wurde ein kommerzielles Kit (QIAquick Purification Kit, Qiagen) verwendet und folgendermaßen vorgegangen:

1. Zu 100 µl PCR-Produkt 500 µl Puffer PB (aus Kit) zugeben und vortexen
2. QIAquick Spin Säule in ein 2 ml Collecting Tube (CT) stellen
3. Gesamte Probe auf Säule auftragen und 60 sec bei 13000 x g zentrifugieren
4. Durchfluss verwerfen, Säule auf frisches 2 ml CT ohne Deckel stellen
5. 750 µl Puffer PE (aus Kit) zugeben und 60 sec bei 13000 x g zentrifugieren
6. Durchfluss verwerfen und Säule auf ein frisches CT stellen, 1 min bei 13000 g zentrifugieren
7. Säulchen auf frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß stellen
8. Zur Elution der DNA 50 µl Puffer EB (aus Kit) auf das Zentrum der Säule pipettieren und 1-3 min bei Raumtemperatur stehen lassen
9. 1 min bei 13000 x g zentrifugieren

Bei diesem Verfahren erfolgt eine Aufkonzentrierung der Probe um den Faktor 2, da ca. 100 µl Probe in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen werden.

Vor dem Einsatz in die Sequenzier-PCR wurden die aufgereinigten Proben noch einmal mit

dem Bioanalyzer überprüft.

Für die Sequenzier-PCR wurden ca. 20-100 ng (5 µl) des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt. Es wurde das BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet, das unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide enthält. Während der Sequenzierreaktion entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, da es beim Einbau eines Didesoxynukleotides zum Kettenabbruch kommt. Je nach letzter, synthetisierter Base sind die Fragmente mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Der Reaktionsansatz, der für jede Probe jeweils mit dem forward und dem reverse Primer getrennt durchgeführt wurde, ist in Tabelle 10 angegeben. Das Temperatur- und Zeitprofil der Sequenzierreaktion gibt Tabelle 11 wieder.

Tabelle 10 Zusammensetzung des Mastermixes für die Sequenzierreaktion

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
Ready Reaction Mix		4
Big Dye Buffer (10x)	1x	2
Spezifischer forward bzw. reverse Primer (10 µM)	1 µM	2
Aqua dest		6,5
DMSO		0,5
Aufgereinigtes PCR-Produkt		5
Gesamt		20

Tabelle 11 Temperatur- und Zeitprofil der Sequenzierreaktion

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung / Aktivierung der Polymerase	96°C	1 min	-
Zyklus- phase	Denaturierung 96°C	10 sec	29 x
	Annealing Primer-spezifische Temperatur – 5°C	5 sec	
	Extension 60°C	4 min	

Nach der Sequenzier-PCR wurden die erhaltenen markierten Fragmente zur Aufreinigung mit Natriumacetat gefällt. Hierfür wurden zu 20 µl Probe 2 µl EDTA, 2 µl Natriumacetat und 50 µl Ethanol (100%) zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit gewaschen. Nach Abnehmen des Alkohols wurde die Probe mit offenem Deckel im Dunkeln mindestens 20 Minuten bei 50°C getrocknet. Anschließend wurde das

Pellet in 20 µl HPLC-Wasser aufgenommen.

Zur Identifizierung wurden die Proben mit HPLC-Wasser verdünnt (in der Regel 10 µl H₂O + 6 µl Sequenzierprobe) und mit dem Sequenzier-Gerät 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) analysiert, bei dem die unterschiedlich langen DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und von einem Detektor erkannt werden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm SeqMan der DNASTAR Lasergene Software. Die Sequenzen, die mit dem forward und dem reverse Primer identifiziert wurden, wurden einem Alignment unterzogen und zu einer Consensus-Sequenz vereint.

2.5. Entwicklung eines spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für *C. lari*

2.5.1. Sequenzierung eines Abschnittes des Gyrase-Gens (*gyrA*) von ausgewählten Stämmen von *C. lari*

Anhand eines Alignments der verfügbaren Sequenzdaten für die Gyrase von 18 Stämmen von *C. jejuni*, 12 Stämmen von *C. coli*, vier Stämmen von *C. fetus* und zwei Stämmen von *C. lari*, das mithilfe der Software Genedoc (Version 2.6.02) erstellt worden war, wurden Primer in konservierten Bereichen zur Amplifizierung eines Abschnittes des Gyrase-Gens von ca. 650 Basenpaaren von *Campylobacter* spp. entwickelt. Es wurde das Programm PrimerSelect der DNASTAR Lasergene Software angewendet, um die Schmelztemperatur und den G/C-Gehalt der ausgewählten Primersequenzen zu bestimmen. Mit dem Programm wurden die Primer auch auf Dimer- und Hairpinbildung überprüft. Die Sequenzen der Primer A1-*gyrA*-camp fw und A1-*gyrA*-camp re, ihre Position auf dem *gyrA*-Gen und ihre Eigenschaften sind unter D.1.2 dargestellt.

Mit den entwickelten Primern konnte DNA von zwölf verschiedenen *C. lari*-Stämmen mit einem hinsichtlich der MgCl₂-Konzentration optimierten Protokoll für eine konventionelle PCR erfolgreich amplifiziert und zur Sequenzierung eingesetzt werden. Es wurde außerdem ein Stamm von *C. jejuni* als Positivkontrolle mitgeführt sowie vier Stämme von *C. coli*, da die Sequenzen von *C. coli* in dem hier amplifizierten Bereich nicht vollständig bekannt waren. Einen Überblick über die amplifizierten Stämme gibt Tabelle 12.

Tabelle 12 Stämme zur Amplifizierung und Sequenzierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von *Campylobacter* spp.

Spezies	Stamm (Herkunft siehe 1.1.1 und 1.1.2)
<i>C. lari</i>	DSMZ 11375
<i>C. lari</i>	2910
<i>C. lari</i>	72
<i>C. lari</i>	156
<i>C. lari</i>	1745
<i>C. lari</i>	1807
<i>C. lari</i>	L 2979
<i>C. lari</i>	L1880/1
<i>C. lari</i>	L1880/2
<i>C. lari</i>	CCUG 19512
<i>C. lari</i>	CCUG 23947
<i>C. lari</i>	CCUG 18294
<i>C. jejuni</i>	3642
<i>C. coli</i>	3629
<i>C. coli</i>	3644
<i>C. coli</i>	DSMZ 4689
<i>C. coli</i>	2033

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die konventionelle PCR sowie das Temperatur- und Zeitprofil der konventionellen PCR sind in nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 13 Zusammensetzung des Mastermixes zur Amplifizierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von *Campylobacter* spp.

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
10x PCR Buffer (Qiagen)	1x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM	1,5
dNTPs (2,5 mM each)	0,25 mM	2,5
HotStar Taq DNA Polymerase (5 units/µl) (Qiagen)	1 U	0,2
Primer A1- <i>gyrA</i> -camp fw (10 µM)	800 nM	2
Primer A1- <i>gyrA</i> -camp re (10 µM)	800 nM	2
Aqua dest		9,3
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 14 Temperatur- und Zeitprofil für PCR zur Amplifizierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von *Campylobacter* spp.

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Initiale Denaturierung / Aktivierung der Polymerase	94°C	15 min	-
Zyklus- phase	Denaturierung	94°C	30 sec
	Annealing	55°C	45 sec
	Extension	72°C	1:30 min
Extension	72°C	5 min	-

Aus DNA der verschiedenen Stämme wurden jeweils insgesamt 100 µl PCR-Produkt für die Sequenzierung hergestellt. Die Sequenzierung wurde nach dem Protokoll unter 2.4 unter Verwendung der Primer A1-*gyrA*-camp fw und A1-*gyrA*-camp re (siehe D.1.2) durchgeführt.

2.5.2. Primer- und Sondendesign für ein spezifisches real-time PCR-Nachweissystem für *C. lari*

Aus den erhaltenen Sequenzen der Stämme von *C. lari* sowie der Sequenz von *C. jejuni* und der Sequenz der vier Stämme von *C. coli* wurde mit der DNASTAR Lasergene Software MegAlign unter Verwendung des Clustal W Algorithmus ein Alignment erstellt (siehe Anhang). Es wurden Primer und eine Sonde so gelegt, dass sie spezifisch *C. lari* erfassen. Die Überprüfung der *C. lari*-spezifischen Primer und Sonde auf Dimer- und Hairpinbildung sowie die Ermittlung der Schmelztemperatur und des G/C-Gehaltes erfolgte mithilfe des Programms PrimerSelect der DNASTAR Lasergene Software. Die Basensequenzen und genauen Positionen sowie weitere Eigenschaften der Primer *gyrA1*-fw1, *gyrA1*-fw2, *gyrA1*-re1 und *gyrA1*-re2 und der Sonde *gyrA1* sind unter D.1.3 aufgeführt.

2.6. Quadruplex real-time PCR zum Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

2.6.1. Prinzip

Bei der hier angewendeten Quadruplex real-time PCR ist der parallele Nachweis und die Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* möglich. Das Nachweissystem wurde auf Basis einer bereits veröffentlichten real-time PCR-Methode zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* (Best *et al.*, 2003) entwickelt. Die Primer- und Sondensequenzen für *C. jejuni* basieren dabei auf dem *mapA* Gen für ein membran-assoziiertes Protein und für *C. coli* auf dem *ceuE* Gen für ein periplasmatisches Substratbindungsprotein. Diese Methode wurde mit dem unter 2.5.2 beschriebenen, auf dem Gen für die Gyrase basierenden Nachweissystem für *C. lari* und dem internen Amplifikationskontrollsystem nach Anderson *et al.* (2008) kombiniert. Das interne Amplifikationskontrollsystem (IAC) dient dazu, falsch negative PCR-Ergebnisse aufgrund von Inhibition der Amplifizierung durch Matrixeffekte anzuzeigen. Bei dem hier eingesetzten System wird eine Sequenz des Methyltransferase-Gens aus *Nicotiana tabacum* unabhängig von den *Campylobacter*-spezifischen Nachweissystemen amplifiziert. Es handelt sich um ein Fragment von 81 Basenpaaren, das in Form von klonierter Plasmid-DNA in der Konzentration von ca. 25 Kopien pro Reaktionsansatz zugegeben und bei Abwesenheit inhibitorischer Matrixeffekte stabil amplifiziert wird. Die parallele Detektion der verschiedenen Nachweissysteme ist durch Markierung der verschiedenen TaqMan[®]-Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen möglich. In dieser Arbeit wurde der real-time Cyler Mx3000P (Stratagene) verwendet, der über vier verschiedene Fluoreszenzkanäle verfügt und somit die Signale unabhängig voneinander messen kann. In nachfolgender Tabelle sind die unterschiedlichen Farbstoffe, mit denen die TaqMan[®]-Sonden zur Messung in den vier verschiedenen Kanälen markiert wurden, mit ihren Wellenbereichen, in denen sie Licht emittieren, aufgeführt.

Tabelle 15 Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der spezifischen TaqMan[®]-Sonden

Fluoreszenzfarbstoff	Wellenbereich (nm)	Verwendeter Quencher	Nachweis von
6-Carboxyfluorescein (FAM)	492-516	Dimethylaminoazosulfonsäure (DABSYL)	<i>C. jejuni</i>
Cyanin 5 (CY5)	635-665	Blackberry (BBQ)	<i>C. coli</i>
Sulforhodamin 101 Chlorsäure (Texas Red)	585-610	Blackberry (BBQ)	<i>C. lari</i>
Hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX)	535-555	6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA)	IAC

2.6.2. Primer und Sonden

In Tabelle 16 sind die Basensequenzen der bei der Quadruplex real-time PCR eingesetzten Primer und Sonden aufgeführt. Bei den Sonden ist auch die Markierung mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen und Quenchern angegeben.

Tabelle 16 Primer- und Sondensequenzen der Quadruplex real-time PCR zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Nachweissystem (Referenz)
Primer mapA-fw	CTG GTG GTT TTG AAG CAA AGA TT	
Primer mapA-re	CAA TAC CAG TGT CTA AAG TGC GTT TAT	<i>C. jejuni</i> (Best <i>et al.</i> , 2003)
Sonde mapA	FAM-TTG AAT TCC AAC ATC GCT AAT GTA TAA AAG CCC TTT-DABSYL	
Primer ceuE-fw	AAG CTC TTA TTG TTC TAA CCA ATT CTA ACA	
Primer ceuE-re	TCA TCC ACA GCA TTG ATT CCT AA	<i>C. coli</i> (Best <i>et al.</i> , 2003)
Sonde ceuE	Cy5-TTG GAC CTC AAT CTC GCT TTG GAA TCA TT-BBQ	
Primer gyrA1-fw1	GAT AAA GAT ACG GTT GAT TTT GTA CC	
Primer gyrA1-fw2	GAT AAA GAT ACA GTT GAT TTT ATA CC	
Primer gyrA1-re1	CAG CTA TAC CAC TTG ATC CAT TAA G	<i>C. lari</i> (diese Arbeit, siehe D.1.3)
Primer gyrA1-re2	TGC AAT ACC ACT TGA ACC ATT A	
Sonde gyrA1	TEXAS-TTA TGA TGA TTC TAT GAG TGA GCC TGA TG-BBQ	
Primer IPC-ntb2-fw	ACC ACA ATG CCA GAG TGA CAA C	
Primer IPC-ntb2-re	TAC CTG GTC TCC AGC TTT CAG TT	
Sonde IPC-ntb2-probe	HEX-CAC GCG CAT GAA GTT AGG GGA CCA-TAMRA	Interne Amplifikationskontrolle (Anderson <i>et al.</i> , 2008)

2.6.3. PCR-Bedingungen

Die Zusammensetzung des Mastermixes und das Temperatur- und Zeitprofil der Quadruplex real-time PCR sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt. Die Primer- und Sondenkonzentrationen sowie die Annealingtemperatur wurden dabei entsprechend dem Protokoll der Duplex-PCR zum Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* nach Best *et al.* (2003) gewählt.

Tabelle 17 Zusammensetzung des Mastermixes der Quadruplex real-time PCR zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)	1x	12,5
Primer mapA-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer mapA-re (20 µM)	300 nM	0,375
Primer ceuE-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer ceuE-re (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1- fw1 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1- re1 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1-fw2 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1-re2 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-re (20 µM)	300 nM	0,375
Sonde mapA (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde ceuE (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde gyrA1 (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde IPC-ntb2-probe (10 µM)	100 nM	0,25
Aqua dest		1,75
Plasmid (25 Kopien pro µl)	25 Kopien	1
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 18 Temperatur- und Zeitprofil der Quadruplex real-time PCR zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung	Fluoreszenz-messung
UNG ¹ -Schritt	50°C	2 min	-	-
Initiale Denaturierung / Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min	-	-
Zyklus- phase	Denaturierung	94°C	30 sec	-
	Annealing	60°C	45 sec	44 x
	Extension	72°C	30 sec	ja

¹ Uracil-N-Glykosilase

Der UNG-Schritt dient zur Vermeidung von Kontaminationen durch Amplifikate aus früheren Reaktionen und damit falsch positiver Ergebnisse. Die Uracil-N-Glykosilase bewirkt die Hydrolyse von Uracil-Glykosidbindungen in DNA-Amplifikaten aus früheren PCR-Reaktionen. Diese Produkte können dann nicht mehr durch die *Taq*-DNA-Polymerase verlängert werden, während die native DNA, die Thymin anstelle von Uracil enthält, amplifiziert wird. Das Enzym wird schließlich während der initialen Denaturierung inaktiviert.

Zur Messung der Fluoreszenz wurden beim real-time Gerät (Stratagene Mx3000P) vor dem Lauf die Kanäle FAM, CY5, ROX (für Texas Red) und HEX angewählt. Die Auswertung erfolgte durch getrennte Betrachtung der Ergebnisse in den verschiedenen Kanälen. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurde für den Threshold (dR) in den einzelnen Kanälen bei allen Läufen ein bestimmter Wert (FAM: 1000, CY5: 100, ROX: 1000, HEX: 200) festgelegt.

2.7. Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR

Bei allen Versuchen zur Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR wurde das unter 2.6.3 beschriebene Protokoll verwendet. Die Proben wurden jeweils im Doppelansatz, bei den Versuchen mit DNA-Verdünnungsreihen (2.7.2.1, 2.7.3) im Dreifachansatz und zur Robustheit (2.7.5) im Sechsfachansatz, untersucht. Bei jedem Lauf wurde eine Positivkontrolle, die eine Mischung aus je 100 pg DNA/µl von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* enthielt und eine Mastermixkontrolle, bei der Wasser als Probe zugegeben wurde, mitgeführt.

2.7.1. Selektivität

Zur Überprüfung der Selektivität der real-time PCR wurde DNA von insgesamt 70 verschiedenen *Campylobacter*-Stämmen sowie von 43 Nicht-*Campylobacter*-Stämmen untersucht.

Dabei handelte es sich um 18 Stämme von *C. jejuni*, acht Stämme von *C. coli*, drei Stämme von *C. hyoilei* und 14 Stämme von *C. lari* zur Untersuchung der Inklusivität der drei spezifischen Nachweissysteme.

Als „Non-Target“-Stämme wurde DNA von 27 Stämmen anderer *Campylobacter* Spezies sowie von 43 Nicht-*Campylobacter*-Stämmen, die entweder nahe Verwandte zu *Campylobacter* spp. darstellen (*Arcobacter* spp., *Helicobacter pylori*) oder ebenfalls lebensmittelrelevant sind, eingesetzt.

Die DNA der *Campylobacter*-Stämme wurde in der Regel in einer Konzentration zwischen 0,5 und 5 ng/µl eingesetzt. Bei den DNA-Extrakten der anderen Bakterienarten waren die Konzentrationen zum Teil nicht bekannt. Es handelte sich dabei entweder um DNA-Extrakte, die mit einem handelsüblichen Kit extrahiert worden waren oder um Überstände von aufgekochten Zellsuspensionen.

Die Amplifizierbarkeit der DNA von „Non-Target“-Stämmen wurde durch den Nachweis von bakterieller DNA in einer konventionellen PCR unter Verwendung von Primern für die 16S rDNA von Bakterien (2.3), gesichert. Somit konnten negative Ergebnisse als tatsächlich negativ gewertet werden.

2.7.2. Nachweisgrenze

2.7.2.1. Verdünnungsreihen von DNA

Um die Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR in DNA-Konzentration bzw. Genom-Kopien pro Reaktionsansatz zu bestimmen, wurde von den drei *Campylobacter*-Referenzstämmen *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 DNA extrahiert, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und jeweils dezimale Verdünnungsreihen der Konzentrationen 1 ng/µl bis 1 fg/µl erstellt. Die Proben jeder Konzentrationsstufe wurden jeweils im Dreifachansatz untersucht.

2.7.2.2. Verdünnungsreihen von Reinkulturen

Die bakterielle Keimzahl, die in einer Voranreicherung vorliegen muss, um mit der Quadruplex real-time PCR nachgewiesen werden zu können, wurde anhand von dezimalen Verdünnungsreihen von bakteriellen Reinkulturen bestimmt. Bei dieser Untersuchung wurde somit auch die DNA-Extraktion der Probe mit berücksichtigt.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze in koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml Anreicherung wurden die Referenzstämmen von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* wie unter 2.1.2 beschrieben in Prestonbouillon angereichert. Anschließend wurden dezimale Verdünnungsreihen der Ausgangssuspension bis zur Verdünnungsstufe 10^{-8} erstellt und die Keimzahl in der Ausgangssuspension in KbE/ml wie unter 2.1.2 beschrieben ermittelt. Von jeder Stufe wurde 1 ml für die DNA-Extraktion (2.2.1) und die anschließende Untersuchung mittels Quadruplex real-time PCR entnommen. Der Versuch wurde mit jedem Referenzstamm der drei *Campylobacter* Spezies jeweils sechsmal durchgeführt.

2.7.2.3. Artifizuell kontaminierte Lebensmittelproben

Die gesamte Nachweismethode einschließlich Anreicherung, DNA-Extraktion und real-time PCR wurde anhand von artifizuell kontaminierten Lebensmittelproben überprüft. Dabei wurde die geringste Anzahl an Keimen bestimmt, die in 25 g Lebensmittelprobe noch nachweisbar ist.

Die artifizuelle Kontamination (Spiking) wurde wie unter 2.1.4 beschrieben durchgeführt. Mit jedem der drei *Campylobacter*-Referenzstämmen wurde der Versuch dreimal durchgeführt. Ein Versuchsansatz umfasste insgesamt elf Anreicherungen mit je 25 g Lebensmittel (Hackfleisch für *C. jejuni* und *C. coli* und Seelachs für *C. lari*). Davon wurden je drei Ansätze mit mutmaßlich 0-1 KbE, 1-5 KbE und 5-10 KbE beimpft. Pro Spikingstufe wurden zu je einem Ansatz zusätzlich je ca. 100 KbE der beiden anderen *Campylobacter* spp. zugegeben.

Zu einer Anreicherungsbouillon wurden als Positivkontrolle ca. 100 KbE des zu testenden Keimes gegeben und eine Anreicherungsbouillon wurde als Negativkontrolle ohne die Zugabe von Keimen mitgeführt. Nach der Beimpfung wurden die Proben bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Es wurden nach 24 und nach 48 Stunden Bebrütung Proben zur Untersuchung mittels Quadruplex real-time PCR entnommen. Die DNA-Extraktion der Proben vor Einsatz in die PCR wurde wie unter 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Zur kulturellen Überprüfung wurde von Proben, die in der PCR positiv waren nach 48 Stunden Bebrütung die Keimzahl in der Probe durch Ausspiralisieren bestimmter Verdünnungsstufen bestimmt (siehe 2.1.2). Die Keimzählung wurde pro Spikingstufe jeweils bei einer der beiden Proben durchgeführt, die nur mit dem zu testenden Keim beimpft worden waren.

2.7.2.4. Test der *Campylobacter*-spezifischen Nachweissysteme im Duplex-Ansatz mit dem internen Amplifikationskontrollsystem

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Nachweisgrenze anhand von Verdünnungsreihen von Reinkulturen und anhand von artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben (2.7.2.2 und 2.7.2.3) wurden zusätzlich zum Quadruplex-Ansatz die einzelnen Nachweissysteme für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* auch jeweils im Duplex-Ansatz, d.h. nur in Kombination mit dem Nachweissystem für die interne Amplifikationskontrolle getestet. Dabei wurde jeweils das Volumen der anderen Primer und Sonden im Mastermix durch Wasser ersetzt. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Mastermixe für die Duplex-Ansätze sind in nachfolgenden Tabellen angegeben. Es wurde das gleiche Temperatur- und Zeitprofil wie bei der Quadruplex real-time PCR (Protokoll siehe 2.6.3) angewendet.

Tabelle 19 Zusammensetzung des Mastermixes zum Nachweis von *C. jejuni* inklusive internem Amplifikationskontrollsystem

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)	1x	12,5
Primer mapA-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer mapA-re (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-re (20 µM)	300 nM	0,375
Sonde mapA (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde IPC-ntb2-probe (10 µM)	100 nM	0,25
Aqua dest		4,5
Plasmid (25 Kopien pro µl)	25 Kopien	1
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 20 Zusammensetzung des Mastermixes zum Nachweis von *C. coli* inklusive internem Amplifikationskontrollsystem

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)	1x	12,5
Primer ceuE-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer ceuE-re (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-re (20 µM)	300 nM	0,375
Sonde ceuE (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde IPC-ntb2-probe (10 µM)	100 nM	0,25
Aqua dest		4,5
Plasmid (25 Kopien pro µl)	25 Kopien	1
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 21 Zusammensetzung des Mastermixes zum Nachweis von *C. lari* inklusive internem Amplifikationskontrollsystem

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)	1x	12,5
Primer gyrA1-fw1 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1-re1 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1-fw2 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer gyrA1-re2 (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-fw (20 µM)	300 nM	0,375
Primer IPC-ntb2-re (20 µM)	300 nM	0,375
Sonde gyrA1 (10 µM)	100 nM	0,25
Sonde IPC-ntb2-probe (10 µM)	100 nM	0,25
Aqua dest		3,75
Plasmid (25 Kopien pro µl)	25 Kopien	1
DNA-Probe		5
Gesamt		25

2.7.2.5. Untersuchung von Gemischen aus DNA aller drei *Campylobacter* Spezies

Es wurde eine dezimale Verdünnungsreihe eines Gemisches aus DNA der drei Referenzstämme von *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 parallel zu einzelnen DNA-Verdünnungsreihen der drei Referenzstämme untersucht. Die Konzentrationen reichten von 1 ng bis 1 fg DNA aller drei Referenzstämme bzw. eines der Referenzstämme pro µl. Der Versuch wurde mit denselben Verdünnungsreihen viermal durchgeführt.

2.7.3. Effizienz und linearer Zusammenhang

Die Effizienz der PCR gibt an, wie erfolgreich ein DNA-Template amplifiziert wird und beschreibt somit die Qualität der PCR. Um eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge der DNA-Probe machen zu können, muss der lineare Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Ct-Wert ermittelt werden. Dieser wurde anhand von dezimalen DNA-Verdünnungsreihen der drei Referenzstämme *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 mit Konzentrationen zwischen 1 ng und 1 fg pro µl ermittelt. Die Proben wurden jeweils im Dreifachansatz untersucht. Aus den Ergebnissen wurden mit der MxPro

Software (Stratagene) durch lineare Regression Standardkurven erstellt. Anhand der Steigung der Standardkurven wurde die Effizienz der Quadruplex real-time PCR nach folgender Gleichung berechnet: Amplifikationseffizienz = $10^{-1/\text{Steigung}-1}$.

2.7.4. Präzision

Zur Bestimmung der Präzision als Maß für die Reproduzierbarkeit der Quadruplex real-time PCR wurden dezimale DNA-Verdünnungsreihen der drei Referenzstämme *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 mit Konzentrationen zwischen 1 ng und 1 fg pro µl untersucht. Es wurden jeweils drei Replikate der Proben eingesetzt. Das Experiment wurde dreimal mit denselben Verdünnungsreihen an aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Es wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der mittleren Ct-Werte der einzelnen Proben der vier verschiedenen Läufe zur Beurteilung der Präzision der Quadruplex real-time PCR berechnet.

2.7.5. Robustheit

Es wurde die Robustheit der Quadruplex real-time PCR hinsichtlich Reagenzienkonzentration und Annealingtemperatur bestimmt. Hierfür wurden je sechs Replikate der Konzentration 100 fg/µl der drei Referenzstämme *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 in vier verschiedenen Läufen mit unterschiedlicher Annealingtemperatur (58°C, 60°C, 62°C und 64°C) untersucht. Innerhalb eines Laufes wurden die Proben jeweils mit Mastermix der optimierten Konzentration und Mastermix mit 20% höherer und 20% niedrigerer Reagenzienkonzentration getestet. Die interne Amplifikationskontrolle wurde ebenfalls in diesen Verhältnissen eingesetzt. Erzielt wurden die verschiedenen Konzentrationen indem die gleiche Probenmenge (5 µl) jeweils zu 20 µl Mastermix (optimale Konzentration), zu 24 µl Mastermix (+ 20%) und zu 16 µl Mastermix (- 20%) der normalen Zusammensetzung (siehe 2.6.3) zugegeben wurde.

Die Robustheit wurde anhand der Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Ct-Werte der Proben bei den unterschiedlichen Bedingungen beurteilt.

2.7.6. Untersuchung von Lebensmittelproben

Es wurden insgesamt 464 Lebensmittelproben nach 48-stündiger Voranreicherungen parallel zur konventionellen Diagnostik mit der Quadruplex real-time PCR untersucht. Die konventionelle Diagnostik wurde wie unter 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben vom Routinelabor des LGL durchgeführt. Für die Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR wurde aus

derselben Voranreicherung nach 48 Stunden ein Aliquot entnommen, DNA extrahiert (Protokoll siehe 2.2.1) und mittels Quadruplex real-time PCR untersucht (Protokoll siehe 2.6.3). Eine Übersicht über die verschiedenen Probenarten gibt Tabelle 22.

Tabelle 22 Lebensmittelproben, die parallel zur Routinediagnostik des LGL mit der Quadruplex real-time PCR untersucht wurden

Kategorie	Beschreibung	Produkte*	Anzahl untersuchter Proben
Geflügel	Hähnchen	Schenkel, Flügel, ganz	122
	Ente	Brust, Keule, ganz	135
	Pute / Truthahn	Ober-, Unterschenkel, Brust, Hackfleisch	45
	Gans	Keule, Brust	29
Fisch und Meeresfrüchte	Austern	ganz	9
	Miesmuscheln	ganz	18
	Muscheln (sonstige)	ganz	5
	Fischfilet	Seelachs, Rotbarsch, Scholle, Viktoriabarsch, Kabeljau, Heilbutt, Dorade, Forelle, Goldbarsch, Königskralle, Lachs, Makrele, Wels, Wolfsbarsch	29
Fleischprodukte	Rindfleisch	Roulade, Beinscheiben, Brust, Braten, Querrippe, Saftsteak	17
	Schweinefleisch	Bauch, Kotelette, Nackensteak, Rücken, Schnitzel, Braten, Brustspitz, Hals	45
Obst- und Gemüseprodukte	Blat Salat	Feldsalat, Salatmischung, Mini-Romana, Blattspinat, Ruccula	10
Insgesamt			464

* nach absteigender Anzahl der untersuchten Proben aufgelistet

Zusätzlich zur Untersuchung nach 48 Stunden Voranreicherung wurde bei 147 Proben bereits nach 24 Stunden 1 ml aus der Voranreicherung für die Untersuchung mittels Quadruplex real-time PCR entnommen. Darunter waren 107 Geflügel-, 12 Muschel-, 16 Schweinefleisch-, neun Rindfleisch-, zwei Fischproben und eine Salatprobe.

2.8. Vergleich der Leistungsfähigkeit der Quadruplex real-time PCR mit der kulturellen Referenzmethode

Die Validierungsparameter zur Bewertung der Quadruplex real-time PCR-Methode im Vergleich zur kulturellen Referenzmethode wurden entsprechend dem von Hübner *et al.* (2002) veröffentlichten Vorschlag für die In-house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren gewählt. Als kulturelles Referenzverfahren diente in dieser Arbeit die In-house-Methode des LGL wie sie unter 2.1.5 und 2.1.6 beschrieben ist.

Die Berechnung der darin festgelegten Validierungskriterien wie Spezifität, Sensitivität, relative Richtigkeit, Falsch-Positiv-Rate, Falsch-Negativ-Rate und statistische Übereinstimmung zum Methodenvergleich von qualitativen Alternativmethoden mit der Referenzmethode erfolgte anhand des vorgegebenen Auswertungsschemas (Tabelle 23).

Tabelle 23 Auswertungsschema für qualitative Nachweisverfahren zur Berechnung von Validierungsparametern bei Methodenvergleichen von Alternativ- und Referenzmethode (Quelle: Hübner *et al.*, 2002)

		Zu validierende Methode		
		positiv	negativ	Summe
Referenzmethode oder reelle Kontamination	positiv	a	b	a+b
	negativ	c	d	c+d
Summe		a+c	b+d	a+b+c+d = n

a = Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analyseergebnisse

b = Anzahl der falsch-negativen Analyseergebnisse

c = Anzahl der falsch-positiven Analyseergebnisse

d = Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analyseergebnisse

Die **Spezifität** bezieht sich auf die Anzahl der mit der Referenzmethode als nicht kontaminiert erkannten Proben und gibt an, wieviel Prozent aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden. Sie berechnet sich als $d/(c+d) \times 100$.

Die **Sensitivität** bezieht sich auf die Anzahl der mit der Referenzmethode als kontaminiert erkannten Proben und gibt an, wieviel Prozent aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden. Sie berechnet sich als $a/(a+b) \times 100$.

Die **relative Richtigkeit** gibt bei mikrobiologischen Prüfverfahren den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche mit der zu validierenden Methode und der Referenz-

methode an gleichen Proben erhalten wurde. Sie berechnet sich als $(a+d)/n \times 100$.

Die **Falsch-Positiv-Rate** ist definiert als Anzahl der Resultate mit positiver Abweichung. Sie gibt an, wieviel Prozent der Proben mit dem alternativen Verfahren als falsch-positive Befunde gewertet wurden und berechnet sich als $c/(c+d) \times 100$.

Die **Falsch-Negativ-Rate** ist definiert als Anzahl der Resultate mit negativer Abweichung. Sie gibt an, wieviel Prozent der Proben mit dem alternativen Verfahren als falsch-negative Befunde gewertet wurden und berechnet sich als $b/(a+b) \times 100$.

Als Testverfahren zur statistischen Auswertung der Validierung wurde die Bestimmung des **Konkordanzindex nach Kappa** (κ) gewählt. Er beschreibt das Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysenparameters und berechnet sich wie folgt:

$$\kappa = 2(ad-bc)/((a+c)(c+d)+(a+b)(b+d))$$

Die Bewertung der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren erfolgt mittels folgender Tabelle:

Tabelle 24 Bewertung des Konkordanzindex κ (Quelle: Sachs, 1997)

Kappa	Übereinstimmung
< 0,10	keine
0,10-0,40	schwache
0,41-0,60	deutliche
0,61-0,80	starke
0,81-1,00	fast vollständige

Die Übereinstimmung wird als genügend bezeichnet, wenn κ größer gleich 0,81 ist.

2.9. Untersuchung von Isolaten aus Lebensmitteln

Mit der Quadruplex real-time PCR wurden insgesamt 201 Isolate aus Lebensmittelproben, die aus der Routinediagnostik des LGL stammten, untersucht. Davon waren 82 Isolate aus Hähnchen-, 77 aus Enten-, 13 aus Puten- bzw. Truthahn-, drei aus Gänse- und 26 aus Muschelproben. Von den auf Blutplatten subkultivierten Isolaten wurde DNA extrahiert (Protokoll siehe 2.2.1) und mittels real-time PCR untersucht (Protokoll siehe 2.6.3). Proben, bei denen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der konventionellen Diagnostik und der Quadruplex real-time PCR-Methode auftraten, wurden zur eindeutigen Identifizierung der DNA-Sequenzierung (Protokoll siehe 2.4) unterzogen. Es wurde entweder ein Abschnitt der 16S rDNA (2.3) oder des Gyrase-Gens (2.5.1) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den veröffentlichten Sequenzen der Gendatenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verglichen.

2.10. Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

Die in dieser Arbeit etablierte Quadruplex real-time PCR-Methode wurde auch mit anderen real-time PCR-Nachweissystemen für *Campylobacter* spp. verglichen, um ihre Leistungsfähigkeit gegenüber anderen PCR-Methoden abzuschätzen. Dabei wurden zwei andere Nachweissysteme im Vergleich getestet, die nachfolgend genauer beschrieben sind.

2.10.1. Nachweissystem nach Josefsen *et al.* (2004) basierend auf der 16S rDNA

Bei dem Nachweissystem von Josefsen *et al.* (2004) handelt es sich um eine auf der 16S rDNA basierende Methode zum gleichzeitigen Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*. Das Nachweissystem differenziert somit nicht zwischen den verschiedenen *Campylobacter* spp.. Es konnte jedoch in Hinblick auf einen positiven oder negativen Nachweis von *Campylobacter* spp. mit der Quadruplex real-time PCR verglichen werden.

Als Primer wurden der forward Primer OT1559 und der reverse Primer 18-1 eingesetzt, die eine Sequenz von 287 Basenpaaren des 16S rRNA-Gens thermophiler *Campylobacter* spp. als Zielregion eingrenzen. Die für dieses Nachweissystem gewählte spezifische Sonde ist mit dem Reporter-Fluorophor FAM und mit dem Quencher-Molekül TAMRA markiert.

Zusätzlich zum *Campylobacter*-Nachweissystem wurde die von Josefsen *et al.* (2004) beschriebene interne Amplifikationskontrolle (IAC) zur Vermeidung falsch-negativer PCR-Ergebnisse mitgeführt. Dieses interne Amplifikationskontrollsystem amplifiziert im selben Reaktionsansatz eine fremde Zielsequenz. Liefert es ein positives Signal, ist auszuschließen, dass Matrixeffekte der Lebensmittelproben die Amplifizierung inhibiert haben und dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben. Die IAC nach Josefsen *et al.* (2004) besteht aus einer synthetisierten DNA-Sequenz von 124 Basenpaaren, die so konstruiert wurde, dass die Primer, die an die Ziel-DNA binden, gleichzeitig auch an die IAC-Sequenz binden können und es so zur Amplifizierung kommt.

Tabelle 25 zeigt die Primer- und Sondensequenzen des *Campylobacter*-Nachweissystems bzw. der IAC nach Josefsen *et al.* (2004).

Tabelle 25 Primer- und Sondensequenzen des *Campylobacter*-Nachweissystems und des internen Amplifikationskontrollsystems nach Josefsen *et al.* (2004)

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')
Forward Primer OT1559	CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG
Reverse Primer 18-1	TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA
16S-Target-Sonde	FAM-TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC-TAMRA
16S-IAC-Sonde	JOE-TTC ATG AGG ACA CCT GAG TTG A-TAMRA
IAC Camp	CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GGC AAC TCA GGT GTC CTC ATG AAT TTG AAG ACA TAA ACA AGG GAC TGG TCT CCG TCC CAA CCA AGA TCA TCC ATC TCC CGC TAT TCT GAC GGT ACC TAG GGA A

Die PCR-Bedingungen, die im Rahmen einer Bachelorarbeit (Breitenwieser, 2007) hinsichtlich der Mastermixzusammensetzung optimiert wurden, sind in Tabelle 26 und Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 26 Zusammensetzung des Mastermixes zur Untersuchung von Lebensmittelproben mit der 16S rDNA PCR nach Josefsen *et al.* (2004)

Komponente (Konzentration)	Konzentration im PCR-Ansatz	Menge pro Ansatz (µl)
Quanti Tect Multiplex Master Mix (Qiagen, Hilden) (2x)	1x	12,5
Primer OT-1559 (10 µM)	440 nM	1,1
Primer 18-1 (10 µM)	480 nM	1,2
16S-Target-Sonde (5 µM)	50 nM	0,25
16S-IAC-Sonde (6 µM)	60 nM	0,25
IAC (4,4 x10 ³ Kopien/µl)	4,4 x 10 ³ Kopien	1
Aqua dest		3,7
DNA-Probe		5
Gesamt		25

Tabelle 27 Temperatur- und Zeitprofil zur Untersuchung von Lebensmittelproben mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004)

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung	Fluoreszenz-messung
UNG-Schritt	50°C	2 min	-	-
Initiale Denaturierung / Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min	-	-
Zyklus- phase	Denaturierung	94°C	30 sec	-
	Annealing	58°C	60 sec	ja
			44 x	

Es wurden insgesamt 218 Lebensmittelproben aus der Routinediagnostik des LGL nach 48-stündiger Voranreicherung parallel zur Quadruplex real-time PCR mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) untersucht. Für die Untersuchung mit der 16S rDNA real-time PCR wurden dieselben DNA-Extrakte eingesetzt wie für die Quadruplex real-time PCR.

Von 56 der 218 Lebensmittelproben, die nach 48-stündiger Voranreicherung mit einer der beiden PCR-Methoden *Campylobacter*-positiv waren, wurden zusätzlich auch die Proben nach 24-stündiger Voranreicherung parallel zur Quadruplex real-time PCR mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) untersucht.

Bei der Durchführung der real-time PCR wurde jede Probe im Doppelansatz untersucht. Zusätzlich wurde bei jedem Lauf eine Reagenzienkontrolle (Mastermixkontrolle mit Wasser statt Proben-DNA) und eine Positivkontrolle (*Campylobacter*-DNA in der Konzentration 100 pg/µl) mitgeführt.

2.10.2. BAX[®] System (DuPont Qualicon)

Beim BAX[®] System (DuPont Qualicon) handelt es sich um ein kommerziell erhältliches, komplettes Detektionssystem mit PCR-Thermocycler und einer integrierten Detektionseinheit. Der Nachweis der PCR-Produkte und die Bewertung der Proben erfolgt automatisch. Für das BAX[®] System gibt es verschiedene Testkits zum Nachweis von Verderbniserregern und lebensmittelpathogenen Keimen. Bei diesem System sind alle benötigten Reagenzien bereits in den PCR-Reagenzgefäßen enthalten. Das real-time PCR Assay für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* soll laut Herstellerangaben die drei Spezies gleichzeitig in weniger als 90 Minuten nachweisen und differenzieren sowie quantifizieren. Neben den *Campylobacter*-spezifischen Nachweissystemen enthält das Assay auch eine interne Amplifikationskontrolle, um falsch negative Ergebnisse anzuzeigen.

Insgesamt wurden mit dem BAX[®] System 78 Anreicherungen von Lebensmittelproben aus der Routinediagnostik des LGL nach 48-stündiger Voranreicherung und 70 Isolate aus Lebensmitteln parallel zur Quadruplex real-time PCR untersucht. Für die Untersuchung wurde aus derselben Voranreicherung wie für die Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden ein Aliquot entnommen. Die DNA wurde entsprechend dem Firmenprotokoll extrahiert (siehe 2.2.2). Für den PCR-Ansatz wurden 30 µl Lysat in die mitgelieferten PCR-Gefäße, die bereits den fertigen Mastermix in lyophilisierter Form enthalten, pipettiert. Das Zeit- und Temperaturprofil des PCR-Laufes ist in der Software des BAX[®] Systems hinterlegt, so dass nur ein Starten des Laufes nötig ist. Die Ergebnisse wurden automatisch mit der BAX[®] Software ausgewertet.

D. Ergebnisse

1. Entwicklung eines spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für *C. lari*

1.1. Wahl des Gens für die Gyrase Untereinheit A (*gyrA*) von *Campylobacter* spp.

Als Zielgen für ein spezifisches real-time PCR-Nachweissystem für *C. lari* wurde das Gen für die Gyrase Untereinheit A (*gyrA*) gewählt, weil für dieses Gen bereits ein real-time PCR-Nachweissystem für *C. jejuni* veröffentlicht wurde (Iijima *et al.*, 2004), welches hinsichtlich seiner Selektivität für *C. jejuni* als sehr gut einzustufen ist (Lick *et al.*, 2007). Dieses Nachweissystem basiert auf einem Abschnitt außerhalb der „quinolone resistance-determining region“ des *gyrA*-Gens (Position 714 bis 824 bezogen auf Sequenz von *C. jejuni* UA580, GenBank accession number L04566). Da die Sequenz von *C. lari* in diesem Bereich bislang nicht bekannt war, wurden Primer in Anlehnung an die bekannten Sequenzen von *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. fetus* entworfen, die diesen Bereich einschließen und in möglichst konservierten Bereichen liegen, um auch DNA-Sequenzen von *C. lari* amplifizieren zu können und Sequenzanalysen zu ermöglichen.

Als Referenzsequenz hinsichtlich der Positionen der beschriebenen Primer und Sonden wurde die Sequenz des *gyrA*-Gens von *C. jejuni* UA580 (GenBank accession number L04566) gewählt, die von Wang *et al.* (1993) komplett entschlüsselt wurde. Sie umfasst insgesamt 2927 bp, wobei ein offener Leserahmen von 2589 bp (Position 286 bis 2875) identifiziert wurde, der für das Polypeptid kodiert.

1.2. Sequenzierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von ausgewählten Stämmen von *C. lari*

Anhand eines Alignments der verfügbaren Sequenzdaten für die Gyrase Untereinheit A von 18 Stämmen von *C. jejuni*, 12 Stämmen von *C. coli*, vier Stämmen von *C. fetus* und zwei Stämmen von *C. lari* wurde ein Primerpaar zur Amplifizierung eines Abschnittes, der den Bereich des real-time PCR-Nachweissystems nach Iijima *et al.* (2004) umfasst, entworfen. Die Primer wurden in Bereiche des Gyrase-Gens gelegt, in dem sich *C. jejuni* und *C. coli* nicht unterscheiden und zu *C. fetus* nur wenige Unterschiede auftreten. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ausschnitte aus dem Alignment, in denen die Primer liegen.

ERGEBNISSE

	/.../	(bezogen auf Sequenz von gi 818858)
	685	695	705	/.../		1305	1315	1325	
gi 28564561 d	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 28564559 d	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 28543250 g	CTGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 28542820 g	CTGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 15791399_c	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 144205 gb	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419981 g	-----	-----	-----	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419973 g	-----	-----	-----	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419975 g	-----	-----	-----	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419979 g	-----	-----	-----	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419977 g	-----	-----	-----	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 47419983 g	-----	-----	-----	/.../	CTACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGTTG	
gi 32135164 e	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 32135162 e	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 32135158 e	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 32135156 e	CCGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 46326989 g	CTGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 32135160 e	CTGCTGCGAT	GCGTTATACT	GAAGCAAAAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 21732250 e	CTGCTGCAAT	GCGTTATACT	GAAGCTAGAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 21732252 e	CTGCTGCAAT	GCGTTATACT	GAAGCTAGAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 21732254 e	CTGCTGCAAT	GCGTTATACT	GAAGCTAGAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 21732257 e	CTGCTGCAAT	GCGTTATACT	GAAGCTAGAA	/.../	-----	-----	-----	-----	
gi 47420011 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTG	
gi 47419995 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419993 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419989 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419985 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419987 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419991 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47419997 g	-----	-----	-----	/.../	CTACA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47420009 g	-----	-----	-----	/.../	CCACT	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 47420007 g	-----	-----	-----	/.../	CCACC	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	GATTATGCTT	
gi 818858 gb	CAGCGCTAT	GCGTTATACT	GAAGCTAGAA	/.../	CTCAA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	TATAATGCTT	
gi 47420005 g	-----	-----	-----	/.../	CTCAA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	TATAATGCTT	
gi 47419999 g	-----	-----	-----	/.../	CTCAA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	TATAATGCTT	
gi 47420003 g	-----	-----	-----	/.../	CTCAA	ATGGAAAGTA	CTTTTGGTGT	TATAATGCTT	

C. jejuni
C. coli
C. lari
C. fetus

Abbildung 2 Ausschnitt aus dem Alignment der Sequenzdaten für die Gyrase Untereinheit A von *Campylobacter* spp. mit Primerregionen (gelb bzw. Abweichungen grün unterlegt) zur Amplifizierung des dazwischen liegenden Sequenzabschnittes (erstellt mit Genedoc; Version 2.6.02)

Es wurde ein Gemisch aus Primern eingesetzt, bei dem sich die verschiedenen Primer dadurch unterscheiden, dass an Stellen, an denen sich die Basen der verschiedenen Spezies unterscheiden, entweder die eine oder die andere Base synthetisiert wurde (degenerierte Basen). Mit den Primern wird ein Abschnitt von 646 Basenpaaren amplifiziert. In Tabelle 28 sind die Sequenzen der Primer, ihre Position auf dem *gyrA*-Gen und ihre Eigenschaften, die mit dem Programm PrimerSelect der DNASTAR Lasergene Software ermittelt wurden, zusammengefasst.

Tabelle 28 Primer zur Amplifizierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von *Campylobacter* spp.

Primer- Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3') ¹	Position ²	Schmelz- temperatur (°C)	G/C-Gehalt (%)
A1- <i>gyrA</i> -camp-fw	GCY GCD ATG CGT TAT ACT GAA G	647-668	49,3	54,5
A1- <i>gyrA</i> -camp-re	CAT WAT MAC RCC VMA AGT RMY TTC CAT	1292-1265	50,7	55,6

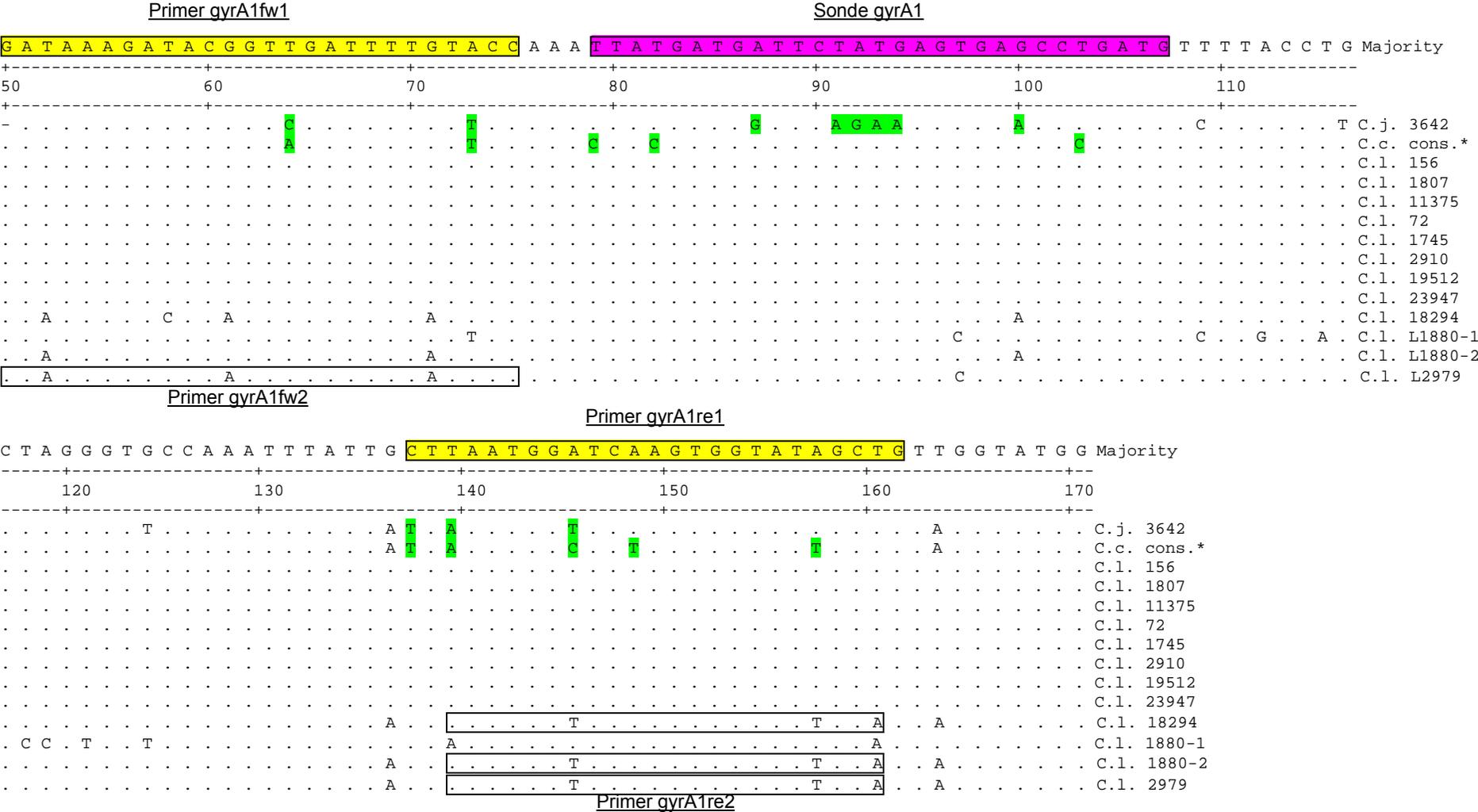
¹ Code für degenerierte Basen: Y = C/T; W = A/T, D = A/G/T; M = A/C; R = G/A; V = A/C/G

² bezogen auf Sequenz von *C. jejuni* UA580, GenBank accession number L04566

1.3. Primer- und Sondendesign für ein spezifisches real-time PCR-Nachweissystem für *C. lari*

Für die Entwicklung eines spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für *C. lari* wurden anhand des Alignments der erhaltenen Sequenzdaten von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* für den Abschnitt der Gyrase Untereinheit A die Primer und die Sonde so gelegt, dass damit alle sequenzierten Stämme von *C. lari* erfasst werden, *C. jejuni* und *C. coli* jedoch aufgrund von unterschiedlichen Basen differenziert werden. Da drei der zwölf sequenzierten Stämme von *C. lari* (18294, L1880-2 und L2979) im Bereich der entworfenen Primer zum Teil Sequenzunterschiede zur Mehrheit der *C. lari*-Stämme (11375, 2910, 72, 156, 1745, 1807, 19512, 23947) aufwiesen, wurden sowohl zwei forward als auch zwei reverse Primer entworfen, die jeweils eine der beiden Gruppen der Stämme von *C. lari* erfassen. Einzelne Basen, die nur bei einem Stamm unterschiedlich waren (v.a. bei Stamm L1880-1) wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Sonde wurde unabhängig von jeweils einer unterschiedlichen Base der Stämme 18294, L1880-1, L1880-2 und L2979 einheitlich für alle Stämme von *C. lari* gewählt. In Abbildung 3 ist der Ausschnitt aus dem Alignment der sequenzierten *Campylobacter*-Stämme mit den Primer- und Sondenregionen des *C. lari*-spezifischen real-time PCR-Nachweissystems dargestellt.

ERGEBNISSE



* Consensus-Sequenz aus vier sequenzierten Stämmen von *C. coli*

Abbildung 3 Ausschnitt aus dem Alignment der Sequenzdaten für die Gyrase Untereinheit A von *Campylobacter*-Stämmen mit Primer- und Sondenregionen des *C. lari*-spezifischen real-time PCR-Nachweissystems (erstellt mit MegAlign; DNASTAR Lasergene Software)

Bei der Entwicklung der Primer und der Sonde für das spezifische Nachweissystem für *C. lari* wurde außerdem berücksichtigt, dass die Schmelztemperaturen der Primer in einem ähnlichen Bereich liegen und die Schmelztemperatur der Sonde höher liegt, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Zudem wurde ein möglichst hoher Gehalt der Basen Guanin und Cytosin angestrebt. Die gewählten Primer und die Sonde, die insgesamt allen Anforderungen am besten entsprachen sind mit ihren Basensequenzen, den genauen Positionen sowie weiteren Eigenschaften in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29 Primer- und Sonde des spezifischen real-time PCR-Nachweissystems für *C. lari* basierend auf dem *gyrA*-Gen

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Position *	Schmelz- temperatur (°C)	G/C-Gehalt (%)
Primer <i>gyrA1-fw1</i>	GAT AAA GAT ACG GTT GAT TTT GTA CC	710-735	51,8	34,6
Primer <i>gyrA1-fw2</i>	GAA AAA GAT ACA GTT GAT TTT ATA CC	710-735	45,5	26,9
Primer <i>gyrA1-re1</i>	CAG CTA TAC CAC TTG ATC CAT TAA G	821-797	51,3	40
Primer <i>gyrA1-re2</i>	TGC AAT ACC ACT TGA ACC ATT A	820-799	50,1	36,4
Sonde <i>gyrA1</i>	TTA TGA TGA TTC TAT GAG TGA GCC TGA TG	739-767	58	37,9

* bezogen auf Sequenz von *C. jejuni* UA580, GenBank accession number L04566

2. Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR

2.1. Selektivität

Die Ergebnisse der Überprüfung der Selektivität der Quadruplex real-time PCR anhand von DNA von insgesamt 70 verschiedenen *Campylobacter*-Stämmen sowie von 43 Nicht-*Campylobacter*-Stämmen sind in Tabelle 30 dargestellt. Die Stämme und ihre Herkunft sind unter C.1.1.1 und C.1.1.2 genauer beschrieben.

Die **Inklusivität** der drei spezifischen Nachweissysteme wurde anhand von 18 Stämmen von *C. jejuni*, elf Stämmen von *C. coli* (darunter drei Stämme von *C. hyoilei*) und 14 Stämmen von *C. lari* untersucht.

Die Bestimmung der **Exklusivität** erfolgte anhand der Ergebnisse der 27 „Non-Target“ *Campylobacter*-Stämme sowie der 43 Stämme anderer bakterieller Spezies.

ERGEBNISSE

Tabelle 30 Ergebnisse der Überprüfung der Selektivität der Quadruplex real-time PCR zum Nachweis von *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

Spezies	Anzahl untersuchter Stämme	Positives Ergebnis für		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
„Target“ <i>Campylobacter</i> spp.				
<i>C. jejuni</i>	18	18	0	0
<i>C. coli</i>	8	0	8	0
<i>C. hyoilei</i>	3	0	3	0
<i>C. lari</i>	14	3*	0	14
„Non-Target“ <i>Campylobacter</i> spp.				
<i>C. concisus</i>	1	0	0	0
<i>C. curvus</i>	1	0	0	0
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	6	0	0	0
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	5	2*	0	0
<i>C. helveticus</i>	2	0	0	0
<i>C. hyointestinalis</i>	3	0	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	8	0	0	0
<i>C. sputorum</i>	1	0	0	0
Nicht-<i>Campylobacter</i> Spezies				
<i>Arcobacter butzleri</i>	1	0	0	0
<i>Arcobacter cibarius</i>	1	0	0	0
<i>Arcobacter cryoaerophilus</i>	1	0	0	0
<i>Arcobacter skirrowii</i>	1	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	0
<i>Clostridium botulinum</i>	4	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	1	0	0	0
<i>E. coli</i>	3	0	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	1	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	0

ERGEBNISSE

<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	0
<i>Helicobacter pylori</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	0	0	0
<i>Salmonella</i>	4	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	0
<i>Shigella boydii</i>	1	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	0	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0	0	0
<i>Shigella sonnei</i>	1	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	0
<i>Yersinia intermedia</i>	1	0	0	0
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	0	0	0
Insgesamt	113			

* schwach positives Signal, d.h. C_t-Wert > 40

Jedes der drei spezifischen Nachweissysteme erfasste jeweils alle entsprechenden *Campylobacter*-Stämme. Die Inklusivität betrug somit 100% für alle drei Nachweissysteme der Quadruplex real-time PCR. Die Ct-Werte lagen dabei im FAM-Kanal (*C. jejuni*-spezifisches Nachweissystem) zwischen 19,0 und 25,1, im CY5-Kanal (*C. coli*-spezifisches Nachweissystem) zwischen 19,8 und 22,6 und im ROX-Kanal (*C. lari*-spezifisches Nachweissystem) zwischen 21,2 und 29,8.

Keine der getesteten Nicht-*Campylobacter* Spezies wurde mit einem der drei spezifischen Nachweissysteme erfasst. Das spezifische Nachweissystem für *C. jejuni* lieferte allerdings für drei Stämme von *C. lari* (72, 156 und L1880/1) und zwei Stämme von *C. fetus* ssp. *venerealis* (1801 und BS 75/04) mit Ct-Werten zwischen 40,1 und 41,7 schwach positive Signale, was somit zu einer Exklusivität von 94,7% führte. Die drei Stämme von *C. hyoilei* reagierten mit dem Nachweissystem für *C. coli* eindeutig positiv. Nach der aktuellen Taxonomie stellt *C. hyoilei* aber keine eigene Spezies mehr dar, sondern wird wieder zu *C. coli* gerechnet

(Vandamme *et al.*, 2005). Damit wies das Nachweissystem für *C. coli* eine Exklusivität von 100% auf. Auch mit dem Nachweissystem für *C. lari* wurde eine Exklusivität von 100% erzielt.

2.2. Nachweisgrenze

2.2.1. Verdünnungsreihen von DNA

Die Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR in DNA-Konzentration bzw. Genom-Kopien pro Reaktionsansatz wurde anhand von dezimalen Verdünnungsreihen von DNA der drei *Campylobacter*-Referenzstämme *C. jejuni* DSMZ 4688, *C. coli* DSMZ 4689 und *C. lari* CCUG 23947 in Konzentrationen von 1 ng/μl bis 1 fg/μl untersucht.

Die Ergebnisse als Mittelwerte der Ct-Werte der drei Replikate jeder Konzentrationsstufe sind in Tabelle 31 aufgeführt. Dabei ist für die drei verschiedenen Spezies jeweils nur das Ergebnis des spezifischen Nachweissystems (gemessen für *C. jejuni* im FAM-Kanal, für *C. coli* im CY5-Kanal und für *C. lari* im ROX-Kanal) angegeben.

Tabelle 31 Bestimmung der Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR anhand von Verdünnungsreihen von DNA

<i>Campylobacter</i> Spezies	DNA-Konzentration pro µl	Ct-Wert des spezifischen Nachweissystems (Mittelwert aus 3 Replikaten)
<i>C. jejuni</i>	1 ng	23,84
<i>C. jejuni</i>	100 pg	27,51
<i>C. jejuni</i>	10 pg	30,95
<i>C. jejuni</i>	1 pg	34,20
<i>C. jejuni</i>	100 fg	37,49
<i>C. jejuni</i>	10 fg	42,04
<i>C. jejuni</i>	1 fg	No Ct
<i>C. coli</i>	1 ng	20,47
<i>C. coli</i>	100 pg	24,49
<i>C. coli</i>	10 pg	28,36
<i>C. coli</i>	1 pg	31,62
<i>C. coli</i>	100 fg	36,71
<i>C. coli</i>	10 fg	No Ct
<i>C. coli</i>	1 fg	No Ct
<i>C. lari</i>	1 ng	21,79
<i>C. lari</i>	100 pg	25,31
<i>C. lari</i>	10 pg	28,93
<i>C. lari</i>	1 pg	32,39
<i>C. lari</i>	100 fg	36,20
<i>C. lari</i>	10 fg	41,31
<i>C. lari</i>	1 fg	No Ct

Die niedrigste Verdünnungsstufe, die noch detektiert wurde, wurde als Nachweisgrenze festgelegt. Da ein Reaktionsansatz 5 µl DNA-Probe enthielt, liegt die Nachweisgrenze für das Nachweissystem für *C. jejuni* bei 50 fg pro Reaktionsansatz, für *C. coli* bei 500 fg pro Reaktionsansatz und für *C. lari* ebenfalls bei 50 fg pro Reaktionsansatz. Legt man zugrunde, dass das Gewicht eines Genoms von *C. jejuni* etwa 1,7 fg beträgt (Josefsen *et al.*, 2004), sind mit der Quadruplex real-time PCR ca. 30 Genom-Kopien von *C. jejuni* und *C. lari* und ca. 300 Genom-Kopien von *C. coli* nachweisbar. Die interne Amplifikationskontrolle wurde bei diesem Versuch mit einem durchschnittlichen Ct-Wert von 34,39 (Standardabweichung 1,312) detektiert. Bei hohen DNA-Konzentrationen von 1 ng/µl waren die Ct-Werte der internen Amplifikationskontrolle erhöht (für *C. jejuni* 39,30 und für *C. lari* 35,81) bzw. es wurde kein Signal detektiert (*C. coli*).

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Amplifikationsplots der verschiedenen Verdünnungsreihen, die in den verschiedenen Kanälen des real-time PCR-Gerätes gemessen wurden. Dabei wurden die einzelnen Kurven der drei Replikate zu jeweils einer Kurve zusammengefasst.

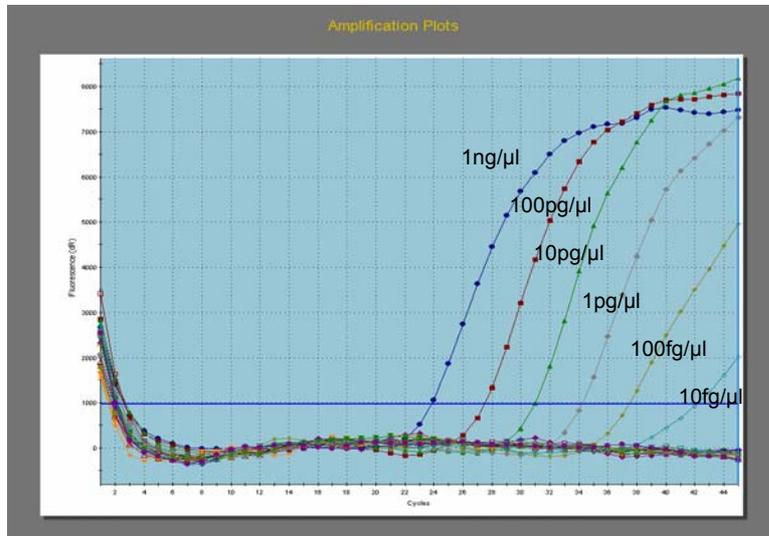


Abbildung 4 Signalkurven einer DNA-Verdünnungsreihe von *C. jejuni* DSMZ 4688 gemessen im FAM-Kanal des Stratagene Mx3000P

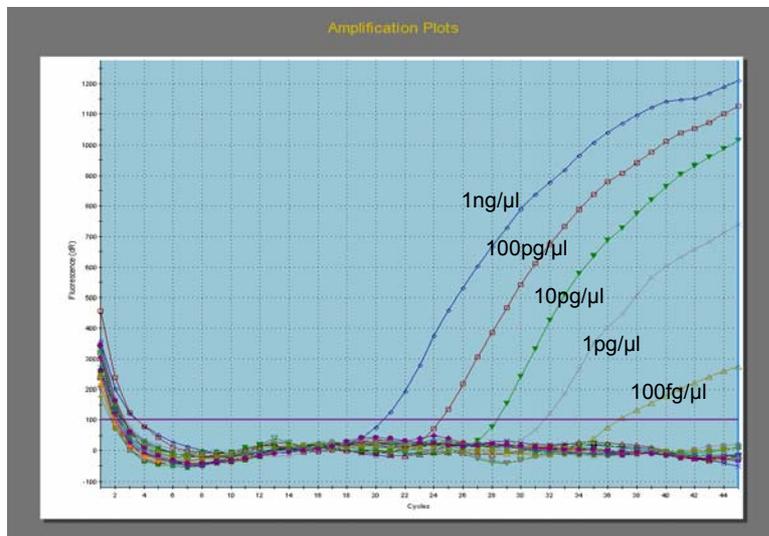


Abbildung 5 Signalkurven einer DNA-Verdünnungsreihe von *C. coli* DSMZ 4689 gemessen im CY5-Kanal des Stratagene Mx3000P

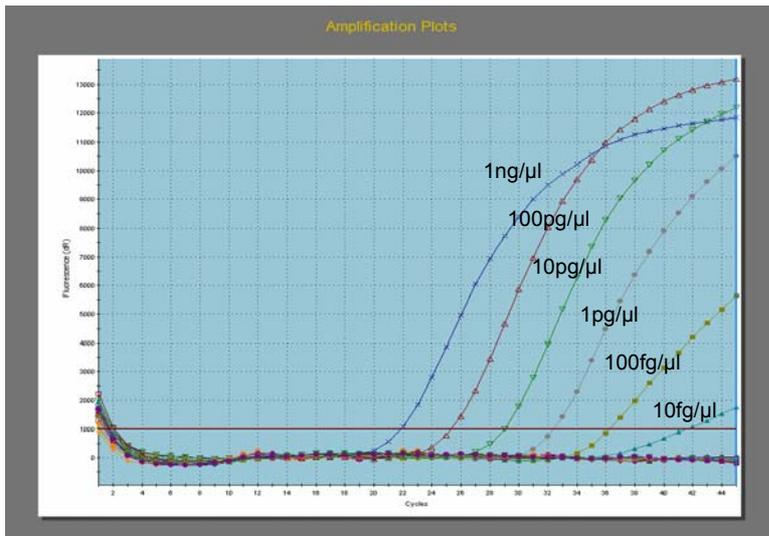


Abbildung 6 Signalkurven einer DNA-Verdünnungsreihe von *C. lari* CCUG 23947 gemessen im ROX-Kanal des Stratagene Mx3000P

2.2.2. Verdünnungsreihen von Reinkulturen

Durch die Untersuchung von dezimalen Verdünnungsreihen von bakteriellen Reinkulturen der Referenzstämmen von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* wurde die Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR in koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml Voranreicherung bestimmt. Dabei wurde die niedrigste Verdünnungsstufe, die noch detektiert wurde, als Nachweisgrenze festgelegt. Die Keimgehalte der einzelnen Verdünnungsstufen bis 10^{-8} wurden durch Ermittlung der Keimzahl in der Ausgangssuspension in KbE/ml bestimmt (siehe C.2.1.2). Der Versuch wurde für alle drei *Campylobacter*-Stämme jeweils sechsmal durchgeführt.

Die Ergebnisse sind untergliedert nach den drei Spezies in den nachfolgenden Abbildungen graphisch dargestellt. Die genauen Keimzahlen und die entsprechenden Ct-Werte sind im Anhang zu finden.

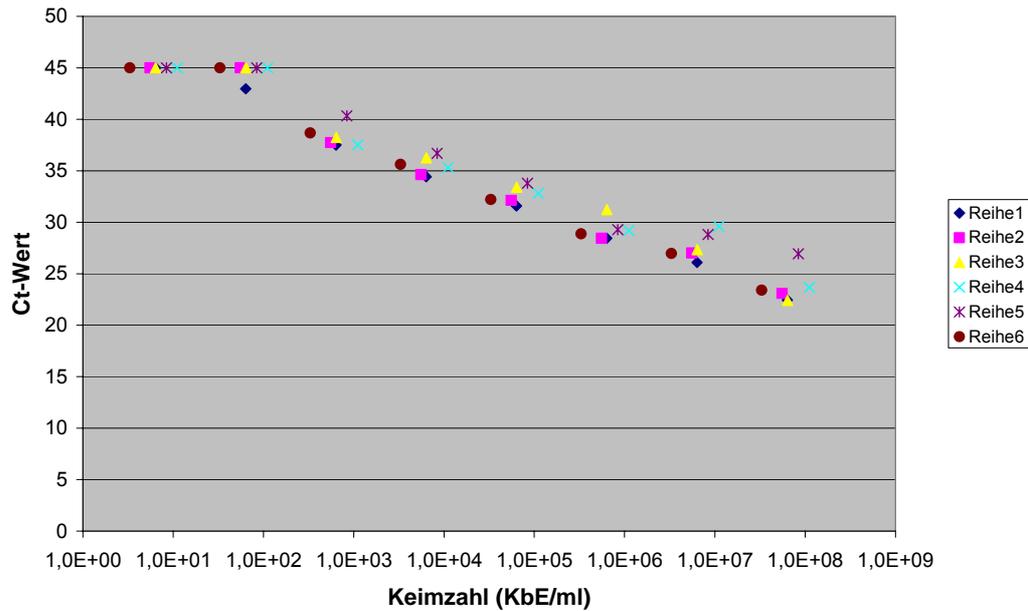


Abbildung 7 Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. jejuni* DSMZ 4688 gemessen im FAM-Kanal des Stratagene Mx3000P

Insgesamt war bei den Versuchen mit den dezimalen Verdünnungsreihen von *C. jejuni* wie erwartet eine Erhöhung der Ct-Werte mit abnehmender Keimkonzentration in der Probe zu erkennen. Im Bereich zwischen 10^3 und 10^6 KbE/ml war der Verlauf mit einer Erniedrigung des Ct-Wertes um durchschnittlich 3 bei Erhöhung der Konzentration um eine 10er-Potenz linear. Die Nachweisgrenze des *C. jejuni*-spezifischen Nachweissystems lag zwischen 64 KbE/ml (Versuch 1) und $1,1 \times 10^3$ KbE/ml (Versuch 4) der verdünnten bakteriellen Voranreicherung. Somit ist mit der Quadruplex real-time PCR bei einem Keimgehalt von mindestens **$1,1 \times 10^3$ KbE/ml** von *C. jejuni* eine Detektionswahrscheinlichkeit von 100% gegeben.

ERGEBNISSE

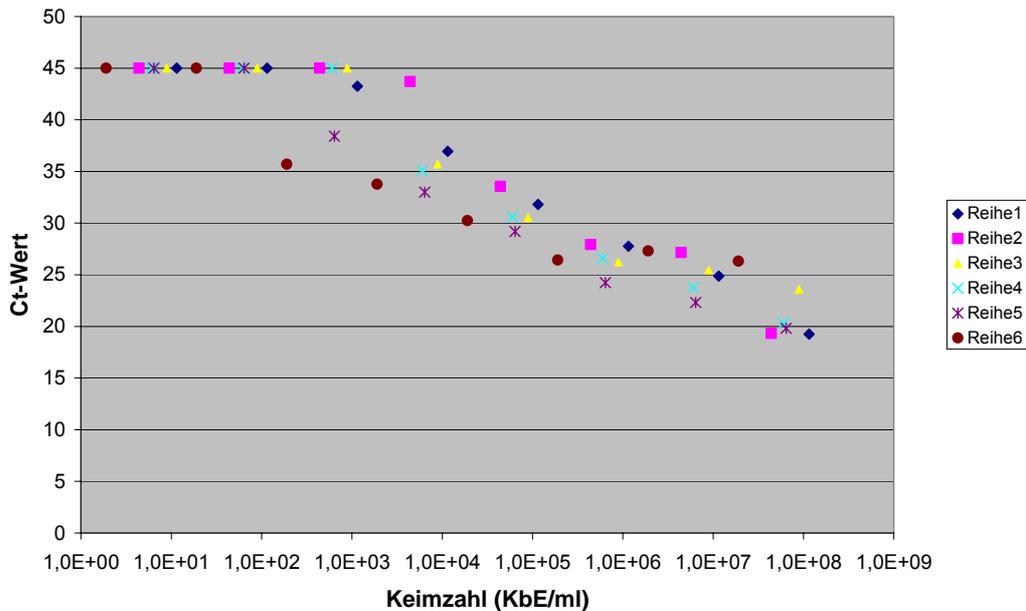


Abbildung 8 Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. coli* DSMZ 4989 gemessen im CY5-Kanal des Stratagene Mx3000P

Bei den Ergebnissen der Verdünnungsreihen von *C. coli* war der lineare Zusammenhang zwischen Keimkonzentration und Ct-Wert gering. Für das spezifische Nachweissystem für *C. coli* wurde eine Nachweisgrenze ermittelt, die zwischen $1,9 \times 10^2$ KbE/ml (Versuch 6) und $8,9 \times 10^3$ KbE/ml (Versuch 3) lag. Eine Detektionswahrscheinlichkeit von 100% ist damit bei einem Keimgehalt von mindestens **$8,9 \times 10^3$ KbE/ml** von *C. coli* gegeben.

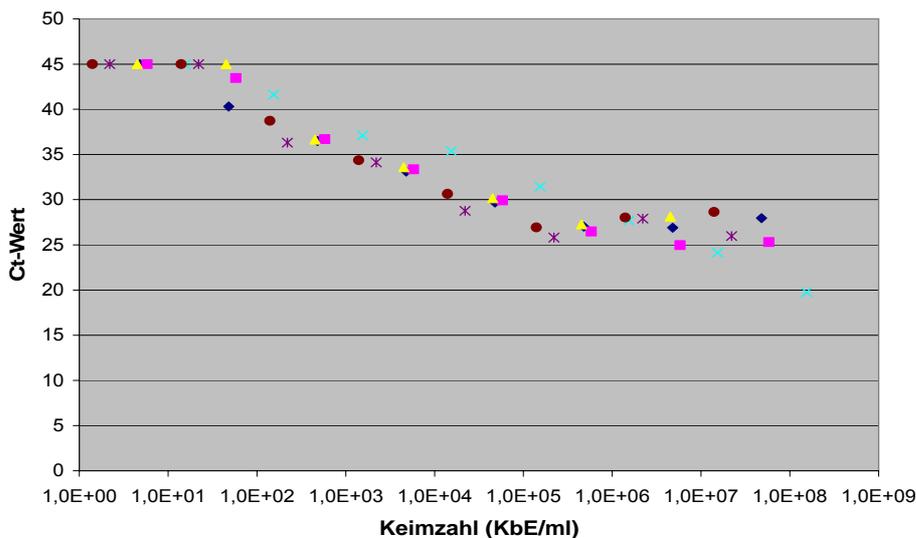


Abbildung 9 Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. lari* CCUG 23947 gemessen im ROX-Kanal des Stratagene Mx3000P

Für die Verdünnungsreihen der Reinkulturen von *C. lari* war der Verlauf für fünf Versuche im Bereich zwischen 10^2 und 10^5 KbE/ml und für den Versuch 4 im Bereich zwischen 10^4 und 10^7 KbE/ml mit einer Erniedrigung des Ct-Wertes um durchschnittlich 3,5 bei Verzehnfachung der Konzentration linear.

Die Nachweisgrenze des spezifischen Nachweissystems für *C. lari* lag zwischen 48 KbE/ml (Versuch 1) und $4,5 \times 10^2$ KbE/ml (Versuch 3) der verdünnten bakteriellen Voranreicherung. Bei einem Keimgehalt von mindestens **$4,5 \times 10^2$ KbE/ml** von *C. lari* beträgt die Detektionswahrscheinlichkeit damit 100%.

2.2.3. Artifiziiell kontaminierte Lebensmittelproben

Durch artifiziielle Kontamination von Lebensmittelproben wurde die geringste Anzahl an Keimen bestimmt, die in 25 g Lebensmittelprobe noch nachweisbar ist. Dabei wurde die gesamte Nachweismethode einschließlich Anreicherung, DNA-Extraktion und real-time PCR überprüft. Die Ergebnisse der Spiking-Versuche, die mit jedem der drei *Campylobacter*-Referenzstämme dreimal durchgeführt wurden, wurden pro Versuchsansatz anhand der Spikingstufe mit der geringsten Keimzahl, die noch nachweisbar war, ausgewertet.

2.2.3.1. Nachweis von *C. jejuni* DSMZ 4688 in artifiziiell kontaminiertem Hackfleisch

2.2.3.1.1. Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe

Die untersuchten Parameter für die Bestimmung der mikrobiellen Hintergrundflora des für die Spikingversuche verwendeten Hackfleisches sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32 Mikrobieller Status von Hackfleisch nach zweitägiger Lagerung im Kühlschrank bei 4°C (für *C. jejuni*-Spiking-Versuch)

Parameter	Keimzahl in KbE/g Hackfleisch		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	$2,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^7$
Koagulase-positive Staphylokokken	< 100	<100	<100
Coliforme Keime	$1,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
<i>E. coli</i>	< 100	$2,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$2,0 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
Pseudomonaden	$4,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$
Säuretolerante Laktobazillen	$7,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^7$	$4,8 \times 10^6$
Hefen	$3,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Wie an den Werten der drei Versuche ersichtlich ist, bewegte sich die mikrobielle Belastung des Hackfleisches jeweils in ähnlichen Bereichen. Bei einer mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl zwischen 10^7 und 10^8 KbE/g Hackfleisch konnten keine Koagulase-positiven Staphylokokken nachgewiesen werden. Die Belastung mit coliformen Keimen war bei Versuch 2 und 3 mit ca. 10^5 KbE/g etwas höher als bei Versuch 1. Dementsprechend war bei Versuch 1 kein Nachweis von *E. coli* möglich, während die Keimzahl für *E. coli* bei Versuch 2 und 3 zwischen 10^2 und 10^3 KbE/g lag. Die Werte für *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden, säuretolerante Laktobazillen und Hefen waren bei Versuch 2 und 3 ebenso um eine bis drei Zehnerpotenzen höher als bei Versuch 1. Hohe Keimzahlen wies das Hackfleisch bei Versuch 2 mit über 10^8 Pseudomonaden und bei Versuch 3 mit über 10^7 *Enterobacteriaceae* auf. Die Keimzahlen lagen somit zum Teil über den Richt- und Warnwerten der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) für bestimmte Mikroorganismen (<http://www.lm-mibi.uni-bonn.de/DGHM.html>), die bei Hackfleisch für die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl bei 5×10^6 KbE/g, für Pseudomonaden bei 10^6 KbE/g und für *Enterobacteriaceae* bei 10^4 KbE/g (Richtwert) bzw. 10^5 KbE/g (Warnwert) liegen. Das Hackfleisch wies damit nach zweitägiger Lagerung eine relativ hohe mikrobielle Hintergrundflora auf, die die Durchführung der Versuche zur artifiziellen Kontamination unter authentischen Bedingungen ermöglichte.

**2.2.3.1.2. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden
Vor-anreicherung**

Die Ergebnisse der Untersuchung der gespikten Proben mit der Quadruplex real-time PCR sowie die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung nach 48 Stunden Bebrütung sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Pro Versuch sind jeweils die Ergebnisse der Negativ- und der Positivkontrolle sowie der niedrigsten Spikingstufe, bei der der Nachweis noch möglich war, mit ihrer genauen Keimkonzentration gezeigt.

Tabelle 33 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. jejuni* in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach 48 Stunden Voranreicherung

Spiking- konzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)			Keimzahl von <i>C. jejuni</i> nach Anreicherung (KbE/ml)
	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> - Nachweis)	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> - Nachweis)	
Versuch 1				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d. ¹⁾
86 KbE <i>C. j.</i>	18,7	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	19,9	No Ct	No Ct	5,3 x 10 ⁸
4 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	19,9	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. j.</i> + 32 KbE <i>C. l.</i> + 122 KbE <i>C. c.</i>	20,8	17,5	19,9	n. d.
Versuch 2				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
64 KbE <i>C. j.</i>	18,7	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	18,9	No Ct	No Ct	3,7 x 10 ⁸
1 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	19,8	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. j.</i> + 117 KbE <i>C. l.</i> + 122 KbE <i>C. c.</i>	24,7	17,5	19,4	n. d.
Versuch 3				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
200 KbE <i>C. j.</i>	16,8	No Ct	No Ct	n. d.
2 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	19,6	No Ct	No Ct	2,2 x 10 ⁸
2 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	18,3	No Ct	No Ct	n. d.
2 KbE <i>C. j.</i> + 34 KbE <i>C. l.</i> + 96 KbE <i>C. c.</i>	19,0	18,8	19,4	n. d.

¹⁾ nicht durchgeführt

Tabelle 33 zeigt, dass der Nachweis von 1 bis 4 KbE (Werte gerundet) von *C. jejuni* in 25 g Hackfleisch möglich war. Der Mittelwert der Ct-Werte der Proben, die nur mit *C. jejuni* gespikkt waren, betrug dabei 19,4 mit einer Standardabweichung von 0,65. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. coli* und *C. lari* in der Probe lagen die Ct-Werte mit 20,8 bei Versuch 1 und 24,7 bei Versuch 2 höher als bei den Proben, zu denen nur *C. jejuni* zugegeben worden war. Bei Versuch 3 war der Ct-Wert der Probe mit den drei verschiedenen *Campylobacter* Spezies hingegen nicht höher als die Proben, die nur *C. jejuni* enthielten. Im ROX-Kanal wurde bei allen drei Versuchen nur bei den auch mit *C. lari* beimpften Proben ein positives Signal mit einem Mittelwert von 17,9 (Standardabweichung 0,74) detektiert. Im CY5-Kanal wurden ebenfalls nur die Proben, die auch mit *C. coli* kontaminiert worden waren, mit einem mittleren Ct-Wert von 19,6 (Standardabweichung 0,28) detektiert. Die Negativkontrollen, die nicht artifiziell kontaminiert waren, lieferten bei keinem Versuch in einem der drei Detektionskanäle ein positives Ergebnis. Die Positivkontrollen waren jeweils positiv mit Ct-Werten, die um ca. ein bis zwei Zyklen niedriger waren als die Proben mit den geringeren Ausgangs-keimzahlen.

Die Keimzahlbestimmung der gespikkten Proben lieferte bei allen drei Versuchen Keimzahlen von über 10^8 KbE/ml, was einer für *C. jejuni* üblichen Vermehrung innerhalb von 48 Stunden Bebrütung entspricht.

2.2.3.1.3. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Voranreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Voranreicherung

Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung derselben Proben mittels real-time PCR bereits nach 24 Stunden.

Tabelle 34 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. jejuni* in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach 24 Stunden Voranreicherung

Spikingkonzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)		
	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> -Nachweis)	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> -Nachweis)
Versuch 1			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
86 KbE <i>C. j.</i>	28,5	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	36,6	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	32,6	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. j.</i> + 32 KbE <i>C. l.</i> + 122 KbE <i>C. c.</i>	35,6	23,2	26,4
Versuch 2			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
64 KbE <i>C. j.</i>	28,3	No Ct	No Ct
1 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	33,2	No Ct	No Ct
1 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	35,3	No Ct	No Ct
1 KbE <i>C. j.</i> + 117 KbE <i>C. l.</i> + 122 KbE <i>C. c.</i>	36,9	23,7	29,0
Versuch 3			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
200 KbE <i>C. j.</i>	22,6	No Ct	No Ct
2 KbE <i>C. j.</i> / Probe 1	33,1	No Ct	No Ct
2 KbE <i>C. j.</i> / Probe 2	30,7	No Ct	No Ct
2 KbE <i>C. j.</i> + 34 KbE <i>C. l.</i> + 96 KbE <i>C. c.</i>	31,9	20,7	25,5

Nach 24 Stunden Inkubation lieferten die Proben hinsichtlich einer positiven oder negativen Entscheidung dieselben Ergebnisse wie nach 48 Stunden Inkubation. Die Ct-Werte waren dabei alle höher als nach 48 Stunden Bebrütung. Mit einem Mittelwert von 33,6 lagen die Ct-Werte der nur mit *C. jejuni* kontaminierten Proben um 14,2 Zyklen höher als nach 48 Stunden und wiesen mit einer Standardabweichung von 2,1 eine größere Streuung auf. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. coli* und *C. lari* in der Probe waren die Ct-Werte bei Versuch 1 und 2 wie auch nach 24 Stunden etwas höher als bei den Proben, die nur mit *C. jejuni* beimpft waren. Bei Versuch 3 hingegen entsprach der Ct-Wert von 31,9 der Probe mit den drei verschiedenen *Campylobacter* Spezies dem Mittelwert der beiden Proben, die nur

C. jejuni enthielten. Das gleiche Verhältnis war auch nach 48 Stunden erkennbar. Im ROX-Kanal lagen die Werte mit durchschnittlich 22,5 um zwei bis zehn Zyklen höher als nach 48 Stunden. Im CY5-Kanal waren die Ct-Werte mit einem Mittelwert von 27,0 um sechs bis zehn Zyklen höher. Insgesamt war auch in diesen Kanälen die Streuung der Ct-Werte zwischen den Versuchen höher als nach 48 Stunden Bebrütung. Der Unterschied der Ct-Werte der Positivkontrollen zu den Proben mit den geringeren Ausgangskeimzahlen war nach 24 Stunden Inkubation mit fünf bis elf Zyklen deutlich größer als nach 48 Stunden mit ein bis zwei Zyklen. Insgesamt wurden bei den Spikingversuchen mit *C. jejuni* alle Proben, die nach 48 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR *Campylobacter*-positiv waren, bereits auch nach 24 Stunden detektiert.

2.2.3.2. Nachweis von *C. coli* DSMZ 4689 in artifiziell kontaminiertem Hackfleisch

2.2.3.2.1. Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe

Die untersuchten Parameter für die Bestimmung der mikrobiellen Hintergrundflora des für die Spikingversuche verwendeten Hackfleisches sind in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35 Mikrobieller Status von Hackfleisch nach zweitägiger Lagerung im Kühlschrank bei 4°C (für *C. coli*-Spiking-Versuch)

Parameter	Keimzahl in KbE/g Hackfleisch		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	3,1 x 10 ⁷	3,8 x 10 ⁷	6,1 x 10 ⁷
Koagulase-positive Staphylokokken	<100	<100	<100
Coliforme Keime	9,7 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁴
<i>E. coli</i>	<100	<100	4,0 x 10 ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,5 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶
Pseudomonaden	1,9 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁷	2,4 x 10 ⁷
Säuretolerante Laktobazillen	1,2 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶
Hefen	1,8 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵	7,4 x 10 ⁵

Das verwendete Hackfleisch für die drei Versuche zur artifiziellen Kontamination mit *C. coli* wies für alle untersuchten Parameter jeweils ähnliche Keimzahlen auf. Die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl lag zwischen 10⁷ und 10⁸ KbE/g und somit über dem Richtwert der DGHM von 5 x 10⁶ KbE/g. Für Koagulase-positive Staphylokokken war die Untersuchung negativ.

Die Zahl der coliformen Keime war bei Versuch 1 mit knapp 10^6 KbE/g um fast Faktor 100 höher als bei Versuch 2 und 3. *E. coli* konnte allerdings nur bei Versuch 3 nachgewiesen werden. Die Werte für *Enterobacteriaceae* lagen mit 10^5 bis 10^6 KbE/g über dem Warnwert der DGHM (1×10^5 KbE/g). Bei den Pseudomonaden wurde der Richtwert von 1×10^6 KbE/g bei Versuch 2 und 3 mit ca. 10^7 KbE/g auch etwas überschritten. Das für den Spiking-Versuch verwendete Hackfleisch wies somit nach zweitägiger Lagerung eine relativ hohe mikrobielle Hintergrundflora auf.

**2.2.3.2.2. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden
Vor-anreicherung**

Die Ergebnisse der Untersuchung der gespikten Proben mit der Quadruplex real-time PCR sowie die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung nach 48 Stunden Bebrütung sind in Tabelle 36 zusammengefasst. Pro Versuch sind jeweils die Ergebnisse der Negativ- und der Positivkontrolle sowie der niedrigsten Spikingstufe, bei der der Nachweis noch möglich war, mit ihrer genauen Keimkonzentration gezeigt.

Tabelle 36 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. coli* in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach 48 Stunden Voranreicherung

Spiking- konzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)			Keimzahl von <i>C. coli</i> nach Anreicherung (KbE/ml)
	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> - Nachweis)	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> - Nachweis)	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)	
Versuch 1				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d. ¹⁾
130 KbE <i>C. c.</i>	19,8	No Ct	No Ct	n. d.
7 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	24,8	No Ct	No Ct	$6,2 \times 10^6$
7 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	25,3	No Ct	No Ct	n. d.
7 KbE <i>C. c.</i> + 18 KbE <i>C. l.</i> + 66 KbE <i>C. j.</i>	24,2	24,3	20,4	n. d.
Versuch 2				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
80 KbE <i>C. c.</i>	21,5	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	19,2	No Ct	No Ct	$4,2 \times 10^7$
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	18,7	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. c.</i> + 44 KbE <i>C. l.</i> + 220 KbE <i>C. j.</i>	19,1	19,8	22,8	n. d.

ERGEBNISSE

Versuch 3

0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
40 KbE <i>C. c.</i>	18,5	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	19,1	No Ct	No Ct	4,5 x 10 ⁷
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	18,5	No Ct	No Ct	n. d.
4 KbE <i>C. c.</i> + 19 KbE <i>C. l.</i> + 66 KbE <i>C. j.</i>	23,5	19,1	21,1	n. d.

¹⁾ nicht durchgeführt

Für *C. coli* war mittels Quadruplex real-time der Nachweis von 4 bis 7 KbE (Werte gerundet) in 25 g Hackfleisch möglich. Die Ct-Werte der Proben, die nur mit *C. coli* kontaminiert waren, lagen beim ersten Versuch mit 24,8 und 25,3 höher als bei Versuch 2 und 3, bei dem sie im Mittel 18,8 mit einer Standardabweichung von 0,25 betragen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. jejuni* und *C. lari* in der Probe lagen die Ct-Werte bei Versuch 1 und bei Versuch 2 im gleichen Bereich wie bei den Proben, die nur mit *C. coli* gespikt waren. Bei Versuch 3 war der Ct-Wert der Probe mit den drei verschiedenen *Campylobacter* Spezies hingegen fast fünf Zyklen höher als bei den Proben des gleichen Versuchs, die nur *C. coli* enthielten. Im ROX-Kanal lieferten bei allen drei Versuchen nur die Proben mit den Keimgemischen ein positives Signal für *C. lari*, das bei Versuch 1 bei Zyklus 24,3 später detektiert wurde als bei Versuch 2 und 3 bei Zyklus 19,8 bzw. 19,1. Im FAM-Kanal wurden ebenfalls nur die Proben mit dem Keimgemisch als positiv für *C. jejuni* erkannt. Der Mittelwert der Ct-Werte betrug hier 21,4 mit einer Standardabweichung von 1,19. Für die Negativkontrollen wurde bei keinem Versuch ein positives Ergebnis detektiert. Die Positivkontrollen waren jeweils positiv für *C. coli*. Der Ct-Wert der Positivkontrolle war bei Versuch 1 fünf Zyklen niedriger, bei Versuch 2 2,5 Zyklen höher und bei Versuch 3 etwa gleich wie die Proben des gleichen Versuchs mit den geringeren Ausgangskeimzahlen.

Die Keimzählung der gespikten Proben ergab bei Versuch 1 nur 6,2 x 10⁶ KbE/ml, was auch die niedrigeren Ct-Werte der Proben dieses Versuchs erklärt. Bei Versuch 2 und 3 wurden Keimzahlen von etwa 4 x 10⁷ KBE/ml ermittelt.

**2.2.3.2.3. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden
Voranreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Voranreicherung**

Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung derselben Proben mittels real-time PCR bereits nach 24 Stunden.

Tabelle 37 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. coli* in artifiziell kontaminierten Hackfleischproben nach 24 Stunden Voranreicherung

Spikingkonzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)		
	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> -Nachweis)	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> -Nachweis)	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)
Versuch 1			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
130 KbE <i>C. c.</i>	32,7	No Ct	No Ct
7 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	35,6	No Ct	No Ct
7 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	31,8	No Ct	No Ct
7 KbE <i>C. c.</i> + 18 KbE <i>C. l.</i> + 66 KbE <i>C. j.</i>	No Ct	25,6	26,7
Versuch 2			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
80 KbE <i>C. c.</i>	25,2	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	33,2	No Ct	no Ct
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	32,8	No Ct	no Ct
4 KbE <i>C. c.</i> + 44 KbE <i>C. l.</i> + 220 KbE <i>C. j.</i>	24,8	23,7	26,7
Versuch 3			
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct
40 KbE <i>C. c.</i>	23,5	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 1	26,8	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. c.</i> / Probe 2	28,0	No Ct	No Ct
4 KbE <i>C. c.</i> + 19 KbE <i>C. l.</i> + 66 KbE <i>C. j.</i>	No Ct	20,8	23,3

Bei der Untersuchung der Proben bereits nach 24 Stunden war bei allen drei Versuchen bei den Proben, die nur mit *C. coli* gespikt waren, der Nachweis möglich. Die Ct-Werte waren dabei alle höher als bei der Untersuchung der Proben nach 48 Stunden Bebrütung. Bei Versuch 1 betrug die Differenz der Mittelwerte aus den zwei Proben etwa acht Zyklen, bei

Versuch 2 etwa 14 Zyklen und bei Versuch 3 etwa neun Zyklen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *C. lari* und *C. jejuni* in der Probe war bei Versuch 1 und 3 nach 24 Stunden Inkubation jedoch noch kein Nachweis möglich. Bei Versuch 2 hingegen konnte *C. coli* sogar mit einem relativ niedrigen Ct-Wert von 24,8 detektiert werden. Der Nachweis von *C. lari* und *C. jejuni* im ROX- bzw. im FAM-Kanal war bei den Proben, die auch mit *C. lari* und *C. jejuni* beimpft worden waren, bereits nach 24 Stunden möglich. Die Ct-Werte unterschieden sich dabei nur um ein bis vier Zyklen von den Ergebnissen nach 48 Stunden Bebrütung. Die Positivkontrollen lieferten ebenfalls bereits nach 24 Stunden positive Ergebnisse für *C. coli*. Somit wurden 83% der nach 48 Stunden Voranreicherung *C. coli*-positiven Proben bereits nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR als *C. coli*-positiv detektiert.

2.2.3.3. Nachweis von *C. lari* CCUG 23947 in artifiziell kontaminiertem Seelachsfilet

2.2.3.3.1. Bestimmung der bakteriellen Hintergrundflora der eingesetzten Lebensmittelprobe

Die untersuchten Parameter für die Bestimmung der mikrobiellen Hintergrundflora des für die Spikingversuche verwendeten Seelachsfilets sind in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38 Mikrobiologischer Status von Seelachsfilet nach zweitägiger Lagerung im Kühlschrank (für *C. lari*-Spiking-Versuch)

Parameter	Keimzahl in KbE/g Seelachs		
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	$3,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$5,3 \times 10^6$
Koagulase-positive Staphylokokken	< 100	< 100	< 100
Coliforme Keime	< 100	< 100	< 100
<i>E. coli</i>	< 100	< 100	< 100
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 100	< 100	$2,5 \times 10^4$
Pseudomonaden	$1,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$2,7 \times 10^6$
Säuretolerante Laktobazillen	< 100	$3,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Hefen	$3,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$

Die mikrobielle Hintergrundflora des Seelachsfilets war im Vergleich zum Hackfleisch niedriger. Der Wert für die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl lag bei Versuch 1 und 2 bei etwa 10^5 KbE/g Seelachs und damit unter dem DGHM-Richtwert für Seefische von 5×10^5 KbE/g, während er bei Versuch 3 um etwa eine Zehnerpotenz höher lag. Bei keiner der

Proben wurden Koagulase-positive Staphylokokken, coliforme Keime oder *E. coli* nachgewiesen. Nur das für Versuch 3 verwendete Seelachsfilet wies *Enterobacteriaceae* im Bereich des DGHM-Richtwertes von 1×10^4 KbE/g auf. Die Werte für Pseudomonaden, säuretolerante Laktobazillen und Hefen waren bei Versuch 1 und 2 relativ niedrig, bei Versuch 3 lagen die Pseudomonaden mit $2,7 \times 10^6$ KbE/g und die Hefen mit $1,8 \times 10^5$ KbE/g etwas höher.

2.2.3.3.2. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung

Die Ergebnisse der Untersuchung der gespikten Proben mit der Quadruplex real-time PCR sowie die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung nach 48 Stunden Bebrütung sind in Tabelle 39 zusammengefasst. Pro Versuch ist jeweils die niedrigste Spikingstufe mit ihrer genauen Keimkonzentration gezeigt, bei der der Nachweis noch möglich war.

Tabelle 39 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. lari* in artifiziell kontaminierten Seelachsfiletproben nach 48 Stunden Voranreicherung

Spiking- konzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)			Keimzahl von <i>C. lari</i> nach Anreicherung (KbE/ml)
	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> - Nachweis)	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> - Nachweis)	
Versuch 1				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d. ¹⁾
44 KbE <i>C. l.</i>	16,5	No Ct	No Ct	n. d.
2 KbE <i>C. l.</i> / Probe 1	17,8	No Ct	No Ct	$8,6 \times 10^7$
2 KbE <i>C. l.</i> / Probe 2	18,4	No Ct	No Ct	n. d.
2 KbE <i>C. l.</i> + ca. 100 KbE <i>C. j.</i> + ca. 100 KbE <i>C. c.</i>	18,1	23,5	No Ct	n. d.
Versuch 2				
0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
28 KbE <i>C. l.</i>	16,9	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. l.</i> / Probe 1	17,6	No Ct	No Ct	$6,7 \times 10^7$
1 KbE <i>C. l.</i> / Probe 2	17,3	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. l.</i> + ca. 100 KbE <i>C. j.</i> + ca. 100 KbE <i>C. c.</i>	18,5	22,3	28,1	n. d.

Versuch 3

0 KbE	No Ct	No Ct	No Ct	n. d.
28 KbE <i>C. l.</i>	16,8	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. l.</i> / Probe 1	16,2	No Ct	No Ct	2,0 x 10 ⁸
1 KbE <i>C. l.</i> / Probe 2	16,9	No Ct	No Ct	n. d.
1 KbE <i>C. l.</i> + 480 KbE <i>C. j.</i> + 120 KbE <i>C. c.</i>	19,6	20,7	23,6	n. d.

¹⁾ nicht durchgeführt

Bei den durchgeführten Versuchen gelang der Nachweis von 1 bis 2 KbE (Werte gerundet) von *C. lari* in 25 g Seelachsfilet. Bei den Proben, die nur mit *C. lari* beimpft worden waren, betrug der Mittelwert der Ct-Werte im ROX-Kanal 17,4 und wies eine Standardabweichung von 0,74 auf. Die Proben, die gleichzeitig auch *C. jejuni* und *C. coli* enthielten, wiesen Ct-Werte zwischen 18,1 und 19,6 auf und lagen damit etwas höher als die Proben, die nur mit *C. lari* kontaminiert waren. Im FAM-Kanal wurden die Proben mit den Keimgemischen als positiv für *C. jejuni* mit Ct-Werten zwischen 20,7 und 23,5 detektiert. *C. coli* wurde im CY5-Kanal nur bei den Proben mit den Keimgemischen in Versuch 2 und 3 nachgewiesen. Bei Versuch 1 war das Ergebnis der auch mit *C. coli* gespikten Probe negativ. Die Negativkontrollen waren bei allen drei Versuchen mit allen Nachweissystemen negativ. Für die Positivkontrollen wurde im ROX-Kanal ein durchschnittlicher Ct-Wert von 16,7 erzielt, der somit nur geringfügig niedriger war als bei den Proben mit den geringeren Ausgangskeimzahlen.

Die Keimzahlen der gespikten Proben mit Werten um 10⁸ KBE/ml bei allen drei Versuchen ließ auf eine gute Vermehrung von *C. lari* in den Proben schließen.

**2.2.3.3.3. Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden
Voranreicherung im Vergleich zu 48 Stunden Voranreicherung**

Nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Proben mittels real-time PCR bereits nach 24 Stunden.

Tabelle 40 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR für den Nachweis von *C. lari* in artifiziell kontaminierten Seelachsfiletproben nach 24 Stunden Voranreicherung

Spikingkonzentration pro 25 g	Ct-Werte (Mittelwert aus Doppelansatz)		
	ROX-Kanal (<i>C. lari</i> -Nachweis)	FAM-Kanal (<i>C. jejuni</i> - Nachweis)	CY5-Kanal (<i>C. coli</i> -Nachweis)
Versuch 1			
0 KBE	No Ct	No Ct	No Ct
44 KBE <i>C. l.</i>	31,1	No Ct	No Ct
2 KBE <i>C. l.</i> / Probe 1	34,4	No Ct	No Ct
2 KBE <i>C. l.</i> / Probe 2	39,7	No Ct	No Ct
2 KBE <i>C. l.</i> + ca. 100 KBE <i>C. j.</i> + ca. 100 KBE <i>C. c.</i>	36,1	36,3	35,5
Versuch 2			
0 KBE	No Ct	No Ct	No Ct
28 KBE <i>C. l.</i>	27,9	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> / Probe 1	35,2	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> / Probe 2	34,7	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> + ca. 100 KBE <i>C. j.</i> + ca. 100 KBE <i>C. c.</i>	No Ct	30,7	28,8
Versuch 3			
0 KBE	No Ct	No Ct	No Ct
28 KBE <i>C. l.</i>	27,5	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> / Probe 1	31,2	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> / Probe 2	34,4	No Ct	No Ct
1 KBE <i>C. l.</i> + 480 KBE <i>C. j.</i> + 120 KBE <i>C. c.</i>	34,1	29,7	No Ct

Bis auf die Probe mit dem Keimgemisch in Versuch 2 konnten alle *C. lari*-positiven Proben bereits nach 24 Stunden Inkubation im ROX-Kanal detektiert werden. Die Ct-Werte der Proben, die nur mit *C. lari* kontaminiert waren hatten einen Mittelwert von 34,9 und wiesen mit einer Standardabweichung von 2,74 eine relativ hohe Streuung auf. Sie waren durchschnittlich um 17,5 Zyklen höher als die Ct-Werte derselben Proben nach 48 Stunden Bebrütung. Die Proben mit den Keimgemischen wurden bei Versuch 1 und 3 im ROX-Kanal bei Ct-Werten im selben Bereich wie die nur mit *C. lari* gespikten Proben detektiert. Bei Versuch 2 war der Nachweis von *C. lari* nach 24 Stunden noch nicht möglich. Im FAM-Kanal konnten die auch mit *C. jejuni* gespikten Proben nach 24 Stunden bereits nachgewiesen

werden. Für *C. coli* wurde bei Versuch 1 und 2 nach 24 Stunden ein positives Signal für die Proben mit den Keimgemischen detektiert. Die Probe in Versuch 1 war nach 48 Stunden jedoch nicht mehr positiv für *C. coli*. Bei Versuch 3 war der Nachweis von *C. coli* nach 24 Stunden noch nicht möglich. Die Positivkontrollen aller drei Versuche wurden nach 24 Stunden ebenfalls im ROX-Kanal bereits detektiert. Die Ct-Werte lagen dabei im Verhältnis zu den Ct-Werten der Proben mit den geringeren Ausgangskeimzahlen niedriger als nach 48 Stunden. Bezogen auf das *C. lari*-Nachweissystem wurden damit 91,7% der nach 48 Stunden positiven Proben bereits nach 24 Stunden detektiert.

2.2.4. Vergleich: Sensitivität von Quadruplex-Ansatz und Duplex-Ansatz

Bei der etablierten Quadruplex real-time PCR wurde überprüft, ob die Anwesenheit der Primer und Sonden der verschiedenen Nachweissysteme im PCR-Ansatz einen negativen Einfluss auf die einzelnen Nachweissysteme hat. Dazu wurden die Proben bei den Versuchen zur Bestimmung der Nachweisgrenze anhand von Verdünnungsreihen von Reinkulturen und anhand von artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben (siehe 2.2.2 und 2.2.3) jeweils parallel auch nur mit dem spezifischen Nachweissystem in Kombination mit dem Nachweissystem für die interne Amplifikationskontrolle (Duplex-Ansatz) getestet. Die Beurteilung erfolgte anhand der Ct-Werte, die sich bei negativem Einfluss zusätzlicher Primer und Sonden im PCR-Ansatz erhöhen würden. Es wurde die Differenz zwischen den Ct-Werten des Quadruplex-Ansatzes und des Duplex-Ansatzes ermittelt. Ein positives Ergebnis bedeutet, dass der Ct-Wert des Quadruplex-Ansatzes höher und somit die Amplifizierung beim Duplex-Ansatz besser war. Ein negatives Ergebnis spricht für den umgekehrten Fall. Proben, die nur mit einem der beiden Ansätze positiv waren, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, sondern einzeln bewertet. Die Ergebnisse wurden für die Versuche mit den Verdünnungsreihen der Reinkulturen und für die Spikingversuche getrennt betrachtet, um mögliche Unterschiede bei Vorhandensein von Lebensmittelmatrix zu erkennen. Bei den Spikingversuchen wurden die Ergebnisse der Untersuchung der Proben nach 24 Stunden und nach 48 Stunden nochmals untergliedert, weil sich die Ct-Werte zwischen den beiden Untersuchungen stark unterschieden.

Tabelle 41 Vergleich der Sensitivität von Quadruplex – und Duplex-Ansatz

Versuch	Differenz der Ct-Werte (Quadruplex-Ansatz-Duplex-Ansatz): Mittelwert (Standardabweichung); Anzahl der Ergebnisse		
	<i>C. jejuni</i> - Nachweissystem	<i>C. coli</i> - Nachweissystem	<i>C. lari</i> - Nachweissystem
Verdünnungsreihen von Reinkulturen	0,55 (0,79); n=37	0,36 (1,07); n=32	0,51 (0,89); n=36
Artifizielle Kontamination von Lebensmittelproben, 24 Stunden Bebrütung	0,38 (0,75); n=26	0,75 (0,58); n=16	0,15 (0,53); n=17
Artifizielle Kontamination von Lebensmittelproben, 48 Stunden Bebrütung	-0,62 (1,52); n=26	1,03 (1,24); n=21	-0,25 (0,64); n=19

Die Daten in der Tabelle zeigen, dass bei den Versuchen mit den Verdünnungsreihen von Reinkulturen die Ct-Werte der Proben bei der Untersuchung mit dem Quadruplex-Ansatz durchschnittlich etwa einen halben Zyklus höher waren als bei der Untersuchung mit dem Duplex-Ansatz. Diese Tendenz war unabhängig von der Höhe der Ct-Werte erkennbar. Bei hohen Verdünnungsstufen im Bereich der Nachweisgrenze wurden die Proben zum Teil nur mit einem der beiden Ansätze, jedoch unabhängig von Duplex- oder Quadruplex-Ansatz, detektiert.

Bei den Versuchen zur artifiziellen Kontamination lagen bei den Nachweissystemen für *C. jejuni* und *C. lari* die Ct-Werte bei der Untersuchung der Proben nach 24 Stunden mit dem Quadruplex-Ansatz durchschnittlich etwas höher als mit dem Duplex-Ansatz. Bei den 48 Stunden-Proben war das Verhältnis für das *C. jejuni*- und *C. lari*-Nachweissystem jedoch umgekehrt. Hier war auffällig, dass die Ct-Werte der 24 Stunden-Proben größtenteils über 30 lagen, während sie bei den 48 Stunden-Proben fast alle zwischen 17 und 20 lagen. Es könnte daher ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Ct-Werte bzw. den DNA-Konzentrationen in den Proben und der besseren Amplifizierbarkeit mit dem Duplex- bzw. Quadruplex-Ansatz bestehen. Für das Nachweissystem für *C. coli* war dieser Zusammenhang nicht erkennbar. Hier waren die Ct-Werte mit dem Quadruplex-Ansatz sowohl bei der Untersuchung der Proben nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden um etwa einen Zyklus höher als mit dem Duplex-Ansatz. Es unterschieden sich aber auch die Ct-Werte zwischen den beiden Untersuchungen nicht so deutlich wie bei den anderen beiden Nachweissystemen.

Insgesamt waren bei Proben, die nur DNA einer der drei Spezies von *Campylobacter* enthielten, kaum Unterschiede zwischen den Ct-Werten von Quadruplex- und Duplex-Ansatz erkennbar.

Allerdings war bei dieser Untersuchung auffällig, dass Proben mit Keimgemischen zum Teil

nur mit dem Duplex-Ansatz und mit dem Quadruplex-Ansatz nicht detektiert wurden. Für das *C. jejuni*-Nachweissystem war dies der Fall bei vier von 18 Proben. Diese Proben hatten mit dem Duplex-Ansatz Ct-Werte von 40,1; 41,0; 37,1 bzw. 37,6, während die anderen 14 Proben Ct-Werte unter 36 hatten und auch mit dem Quadruplex-Ansatz detektiert wurden. Damit wurden insgesamt 77,8% der Proben mit Keimgemischen, die mit dem *C. jejuni*-Nachweissystem im Duplex-Ansatz als positiv detektiert wurden, auch mit dem Quadruplex-Ansatz detektiert. Mit dem *C. coli*-Nachweissystem konnten vier Proben, die bei der Untersuchung mit dem Duplex-Ansatz mit Ct-Werten von 33,4; 31,9; 34,5 bzw. 28,5 positiv waren, mit dem Quadruplex-Ansatz nicht nachgewiesen werden. Hier gelang der Nachweis mit dem Quadruplex-Ansatz bei neun Proben (69,2%), die mit dem Duplex-Ansatz Ct-Werte von unter 25 hatten. Beim Nachweissystem für *C. lari* wurden acht Proben mit Keimgemischen und Ct-Werten unter 35 mit beiden Ansätzen detektiert. Eine Probe mit einem Ct-Wert von 37,7 war nur mit dem Duplex-Ansatz positiv. Es wurden insgesamt 87,5% der mit dem Duplex-Ansatz *C. lari*-positiven Proben auch mit dem Quadruplex-Ansatz detektiert. Es wurde aber bei allen Proben, bei denen mit dem Quadruplex-Ansatz der Nachweis einer bestimmten Spezies im Gegensatz zum Duplex-Ansatz nicht möglich war, jeweils die DNA der beiden anderen Spezies, die mit höheren Keimzahlen zur Probe gegeben worden waren, mit niedrigen Ct-Werten amplifiziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass beim Quadruplex-Ansatz bei Vorhandensein aller drei Targets das Target mit der geringsten Konzentration zum Teil nicht amplifiziert wird. Der Grund hierfür könnte in der Konkurrenz der einzelnen Nachweissysteme um die Reagenzien im PCR-Ansatz liegen. Die in größerer Anzahl vorhandenen Templates setzen sich dabei durch. Dies könnte zu Ergebnissen führen, bei denen eine der drei Spezies nicht nachgewiesen wird, weil sie im Verhältnis zu den anderen beiden Spezies zu niedrig konzentriert war. Die Probe würde jedoch auf jeden Fall als *Campylobacter*-positiv erkannt werden.

2.2.5. Vergleich: Amplifizierung der DNA von nur einer *Campylobacter* Spezies und gleichzeitige Amplifizierung der DNA aller drei *Campylobacter* Spezies

Zur Überprüfung, ob die Zielsequenzen der drei verschiedenen *Campylobacter* Spezies parallel gleichermaßen wie einzeln amplifiziert werden, wurde eine dezimale Verdünnungsreihe eines DNA-Gemisches von je 1 ng/µl bis 1 fg/µl der drei Referenzstämme von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* parallel zu den einzelnen DNA-Verdünnungsreihen der drei Stämme untersucht.

Anhand der Ct-Werte wurde beurteilt, ob die gleichzeitige Amplifizierung der DNA aller drei *Campylobacter* Spezies zu Sensitivitätsverlusten gegenüber ihrer getrennten Amplifizierung führt. Dies wäre an einer Erhöhung der Ct-Werte erkennbar. Es wurde pro Versuch für jedes Nachweissystem die Differenz aus den Ct-Werten der DNA-Gemische und der DNA der einzelnen Spezies berechnet. In Tabelle 42 sind die Mittelwerte der Differenzen der vier Versuche dargestellt.

Tabelle 42 Vergleich von einzelner und gleichzeitiger Amplifizierung der drei Spezies von *Campylobacter*

<i>Campylobacter</i> Spezies	DNA-Konzentration pro µl	Differenz der Ct-Werte aus DNA-Gemisch und DNA einzeln (Mittelwert aus 4 Versuchen)
<i>C. jejuni</i>	1 ng	0,03
<i>C. jejuni</i>	100 pg	0,14
<i>C. jejuni</i>	10 pg	0,08
<i>C. jejuni</i>	1 pg	0,06
<i>C. jejuni</i>	100 fg	0,06
<i>C. jejuni</i>	10 fg	1,37
<i>C. coli</i>	1 ng	0,04
<i>C. coli</i>	100 pg	-0,28
<i>C. coli</i>	10 pg	-0,29
<i>C. coli</i>	1 pg	0,13
<i>C. coli</i>	100 fg	0,61
<i>C. lari</i>	1 ng	0,03
<i>C. lari</i>	100 pg	0,00
<i>C. lari</i>	10 pg	-0,11
<i>C. lari</i>	1 pg	-0,06
<i>C. lari</i>	100 fg	0,18
<i>C. lari</i>	10 fg	1,14

Wie Tabelle 42 zu entnehmen ist, waren die Unterschiede zwischen den Ct-Werten, wenn DNA einer *Campylobacter* Spezies parallel zur DNA der anderen beiden Spezies oder einzeln amplifiziert wurde, für alle drei Nachweissysteme bei DNA-Konzentrationen bis 100fg/µl (für *C. coli* bis 1 pg/µl) minimal. Negative Differenzen bedeuten, dass die Ct-Werte der Proben mit den DNA-Gemischen durchschnittlich sogar niedriger waren als bei den Proben mit DNA von nur einer *Campylobacter* Spezies. Bei niedrigen DNA-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze (für *C. jejuni* und *C. lari* bei 10 fg/µl und für *C. coli* bei 100 fg/µl) war allerdings eine Erhöhung der Ct-Werte um etwa einen Zyklus bei paralleler Amplifizierung der DNA aller drei *Campylobacter* Spezies im Vergleich zur Amplifizierung der DNA von nur einer Spezies erkennbar. Es war somit ein leichter Sensitivitätsverlust der einzelnen Nachweissysteme erkennbar, wenn niedrige DNA-Konzentrationen aller drei *Campylobacter* Spezies parallel amplifiziert wurden.

2.3. Effizienz und linearer Zusammenhang

Nachfolgende Grafiken zeigen die Standardkurven, die die dezimalen DNA-Verdünnungsreihen von 1 ng/µl bis 1 fg/µl der drei *Campylobacter*-Referenzstämme in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen des real-time PCR-Gerätes ergaben. Anhand der Ergebnisse der Triplikate jeder Verdünnungsstufe wurden die jeweiligen Regressionskoeffizienten (R^2) als Maß für den linearen Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Ct-Wert berechnet. Anhand der Steigung der Kurven wurde die Effizienz der einzelnen Nachweissysteme der Quadruplex real-time PCR bestimmt.

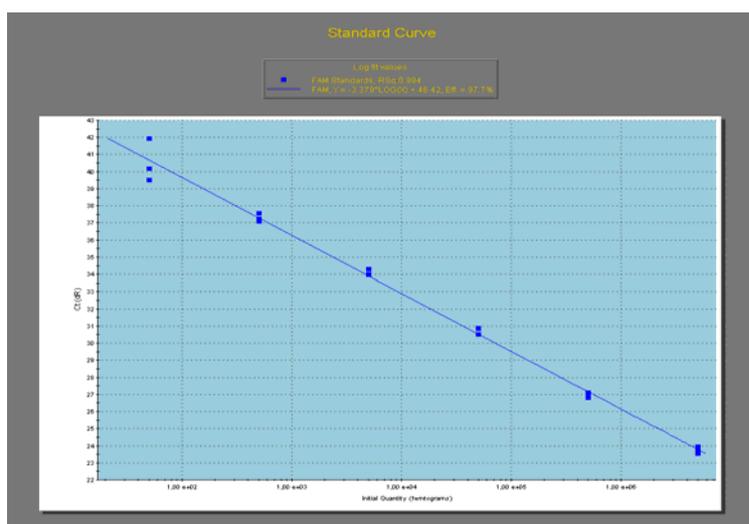


Abbildung 10 Standardkurve einer dezimalen Verdünnungsreihe von DNA von *C. jejuni* DSMZ 4688 gemessen im FAM-Kanal des Stratagene Mx3000P mit $Y = -3,379 \times \log(X) + 46,42$

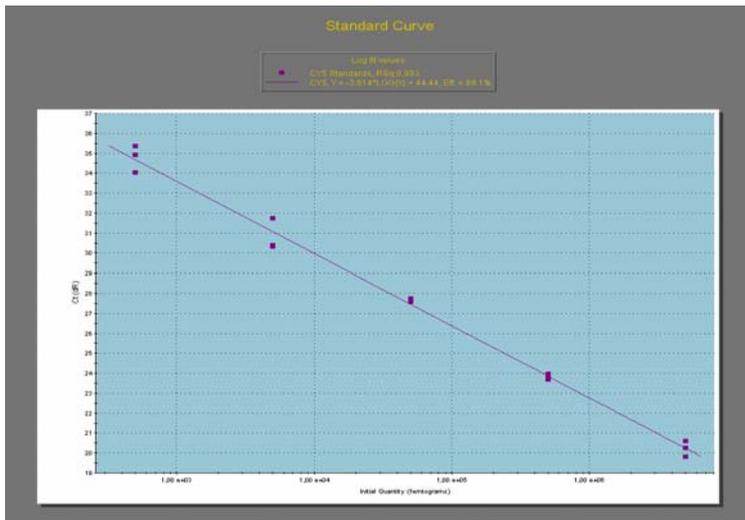


Abbildung 11 Standardkurve einer dezimalen Verdünnungsreihe von DNA von *C. coli* DSMZ 4689 gemessen im CY5-Kanal des Stratagene Mx3000P mit $Y = -3,614 \times \log(X) + 44,44$

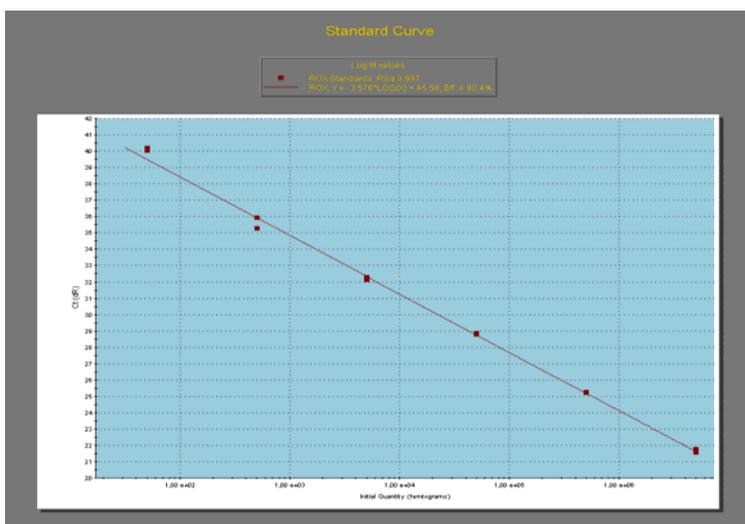


Abbildung 12 Standardkurve einer dezimalen Verdünnungsreihe von DNA von *C. lari* CCUG 23947 gemessen im ROX-Kanal des Stratagene Mx3000P mit $Y = -3,576 \times \log(X) + 45,58$

Mit der MxPro Software (Stratagene) wurden aus den Steigungen der Standardkurven Effizienzen von 97,3% für das *C. jejuni*-Nachweissystem, 89,1% für das *C. coli*-Nachweissystem und 90,1% für das *C. lari*-Nachweissystem berechnet. Die Regressionskoeffizienten (R^2) betragen 0,994 für das *C. jejuni*-, 0,993 für das *C. coli*- und 0,997 für das *C. lari*-Nachweissystem. Diese Werte spiegeln einen starken linearen Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Ct-Wert bei allen drei spezifischen Nachweissystemen wider.

2.4. Präzision

Die Präzision als Maß für die Reproduzierbarkeit der Quadruplex real-time PCR wurde durch wiederholte Untersuchung von dezimalen DNA-Verdünnungsreihen der drei *Campylobacter*-Referenzstämme mit Konzentrationen zwischen 1 ng und 1 fg pro µl an vier aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Pro Lauf wurde der Mittelwert der drei Replikate einer Verdünnungsstufe als Ergebnis gewertet. Die Ergebnisse der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Variationskoeffizienten der mittleren Ct-Werte der vier verschiedenen Experimente sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 43 Ergebnisse der Bestimmung der Präzision der Quadruplex real-time PCR anhand von DNA-Verdünnungsreihen von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

<i>Campylobacter</i> Spezies	DNA- Konzentration pro µl	Ct-Mittelwert	Standard- abweichung	Variations- koeffizient (%)
<i>C. jejuni</i>	1 ng	23,61	0,25	1,1
<i>C. jejuni</i>	100 pg	27,09	0,30	1,1
<i>C. jejuni</i>	10 pg	30,63	0,27	0,9
<i>C. jejuni</i>	1 pg	33,98	0,18	0,5
<i>C. jejuni</i>	100 fg	37,12	0,33	0,9
<i>C. jejuni</i>	10 fg	41,33	0,77	1,9
<i>C. jejuni</i>	1 fg	No Ct		
<i>C. coli</i>	1 ng	20,25	0,17	0,8
<i>C. coli</i>	100 pg	24,04	0,33	1,4
<i>C. coli</i>	10 pg	27,74	0,46	1,7
<i>C. coli</i>	1 pg	31,29	0,38	1,2
<i>C. coli</i>	100 fg	35,68	0,84	2,4
<i>C. coli</i>	10 fg	No Ct		
<i>C. coli</i>	1 fg	No Ct		
<i>C. lari</i>	1 ng	21,66	0,11	0,5
<i>C. lari</i>	100 pg	25,22	0,09	0,4
<i>C. lari</i>	10 pg	28,78	0,11	0,4
<i>C. lari</i>	1 pg	32,24	0,10	0,3
<i>C. lari</i>	100 fg	35,81	0,32	0,9
<i>C. lari</i>	10 fg	41,01	0,73	1,8
<i>C. lari</i>	1 fg	No Ct		

Die Standardabweichungen der Ct-Werte von den Mittelwerten betragen zwischen 0,5% und 1,9% für das *C. jejuni*-Nachweissystem, zwischen 0,8% und 2,4% für das *C. coli*-Nachweissystem und zwischen 0,3% und 1,8% für das *C. lari*-Nachweissystem. Diese Werte sprechen

für eine hohe Präzision der Nachweissysteme. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Präzision bei niedrigen DNA-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze bei 10 fg/µl für *C. jejuni* und *C. lari* mit einem Variationskoeffizient von 1,9% bzw. 1,8% und bei 100 fg/µl für *C. coli* mit 2,4% am geringsten ist.

2.5. Robustheit

Die Ergebnisse der Versuche zur Bestimmung der Robustheit der Quadruplex real-time PCR hinsichtlich Reagenzienkonzentration und Annealingtemperatur sind in Tabelle 44 dargestellt. Es wurden je sechs Replikate in einer Konzentration von 100 fg DNA der drei Referenzstämme *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* pro µl bei vier unterschiedlichen Annealingtemperaturen (58°C, 60°C, 62°C und 64°C) getestet. Zudem wurde der Mastermix mit optimierter, mit 20% höherer und mit 20% niedrigerer Reagenzienkonzentration eingesetzt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert der Ct-Werte der sechs Replikate in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen bei den verschiedenen Bedingungen.

Tabelle 44 Ergebnisse der Bestimmung der Robustheit der Quadruplex real-time PCR anhand von DNA von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* (jeweils 100 fg/µl) bei verschiedenen PCR-Bedingungen

Annealing-Temperatur	<i>Campylobacter</i> Spezies (je 100 fg/µl)	C _t -Wert (Mittelwert aus 6 Replikaten)		
		Optimierte Konzentration	20% niedrigere Konzentration	20% höhere Konzentration
58°C	<i>C. jejuni</i>	35,70	36,19	34,97
	<i>C. coli</i>	33,05	33,05	33,41
	<i>C. lari</i>	34,46	34,26	34,49
60°C*	<i>C. jejuni</i>	35,85	36,07	35,84
	<i>C. coli</i>	33,02	34,18	32,72
	<i>C. lari</i>	35,25	35,25	35,25
62°C	<i>C. jejuni</i>	37,06	37,46	37,08
	<i>C. coli</i>	34,84	35,57	34,66
	<i>C. lari</i>	34,95	35,76	36,28
64°C	<i>C. jejuni</i>	No Ct	No Ct	No Ct
	<i>C. coli</i>	No Ct	No Ct	No Ct
	<i>C. lari</i>	No Ct	No Ct	No Ct

* Optimale Annealingtemperatur

Beim Nachweissystem für *C. jejuni* war bei der optimalen Annealingtemperatur von 60°C kaum ein Einfluss der veränderten Konzentrationen des Mastermixes auf die Ct-Werte erkennbar. Die Erniedrigung der Annealingtemperatur um 2°C bewirkte mit der optimierten

und niedrigeren Konzentration keine Veränderung der Ct-Werte, bei der erhöhten Konzentration war der Ct-Wert um ca. einen Zyklus niedriger. Die Erhöhung der Annealingtemperatur um 2°C führte bei allen drei Konzentrationen zu einer Erhöhung des Ct-Wertes um etwas mehr als einen Zyklus.

Für das Nachweissystem für *C. coli* kam es bei der optimalen Annealingtemperatur von 60°C bei einem um 20% niedriger konzentrierten Mastermix zur Erhöhung des Ct-Wertes um ca. einen Zyklus. Bei einer Annealingtemperatur von 58°C traten keine Veränderungen der Ct-Werte auf, bei 62°C erhöhten sich die Ct-Werte bei der optimierten und höheren Konzentration um 1,8 bzw. 1,6 Zyklen, bei der niedrigeren Konzentration sogar um ca. 2,5 Zyklen.

Das Nachweissystem für *C. lari* zeigte ebenfalls keine veränderten Ct-Werte bei Veränderung der Konzentration des Mastermixes bei 60°C Annealingtemperatur. Bei erniedrigter Annealingtemperatur waren die Ct-Werte bei allen drei Konzentrationen zwischen 0,75 und 1 Zyklen niedriger. Bei Erhöhung der Annealingtemperatur auf 62°C war der Ct-Wert bei optimierter Mastermix-Konzentration etwa gleich, bei niedrigerer Konzentration lag er um einen halben Zyklus und bei erhöhter Konzentration um einen Zyklus höher.

Bei einer Annealingtemperatur von 64°C war mit keinem der drei spezifischen Nachweissysteme ein Nachweis möglich.

Die interne Amplifikationskontrolle war bei allen Versuchen positiv und wies mit Ct-Mittelwerten von 34,5 bei 60°C und 34,3 bei 58°C und bei 62°C Annealingtemperatur geringe Streuungen zwischen den Proben unabhängig von der Konzentration des Mastermixes auf. Bei einer Annealing-Temperatur von 64°C waren die Ct-Werte bei der optimierten und erniedrigten Konzentration erhöht (36,0 und 36,2) und insgesamt mit einer Standardabweichung von 1,26 Zyklen stärker gestreut.

Insgesamt ist die Quadruplex real-time PCR als sehr robust gegenüber Konzentrationschwankungen der Reagenzien von $\pm 20\%$ und Veränderungen der Annealingtemperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$ zu bewerten, da sich die Ct-Werte nicht oder nur um ein bis zwei Zyklen veränderten. Am empfindlichsten reagierte das *C. coli*-Nachweissystem auf eine Erhöhung der Annealingtemperatur um 2°C in Kombination mit der Erniedrigung der Reagenzienkonzentration im Mastermix mit einer Erhöhung des Ct-Wertes um ca. 2,5. Tendenziell hatten eine Erhöhung der Annealingtemperatur um 2°C und eine Erniedrigung der Mastermixkonzentration eher einen negativen Einfluss auf die spezifischen Nachweissysteme.

2.6. Untersuchung von Lebensmittelproben

2.6.1. Untersuchung von Lebensmittelproben nach 48 Stunden Vor-anreicherung mittels konventioneller Diagnostik und Quadruplex real-time PCR

Mit der Quadruplex real-time PCR wurden insgesamt 464 Lebensmittelproben nach 48-stündiger Voranreicherung parallel zur konventionellen Diagnostik analysiert. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt.

2.6.1.1. Nachweis von *Campylobacter* spp. mittels konventioneller Diagnostik

Die Ergebnisse der konventionellen Diagnostik hinsichtlich eines positiven oder negativen Nachweises für thermophile *Campylobacter* spp. sind in Abbildung 13 dargestellt.

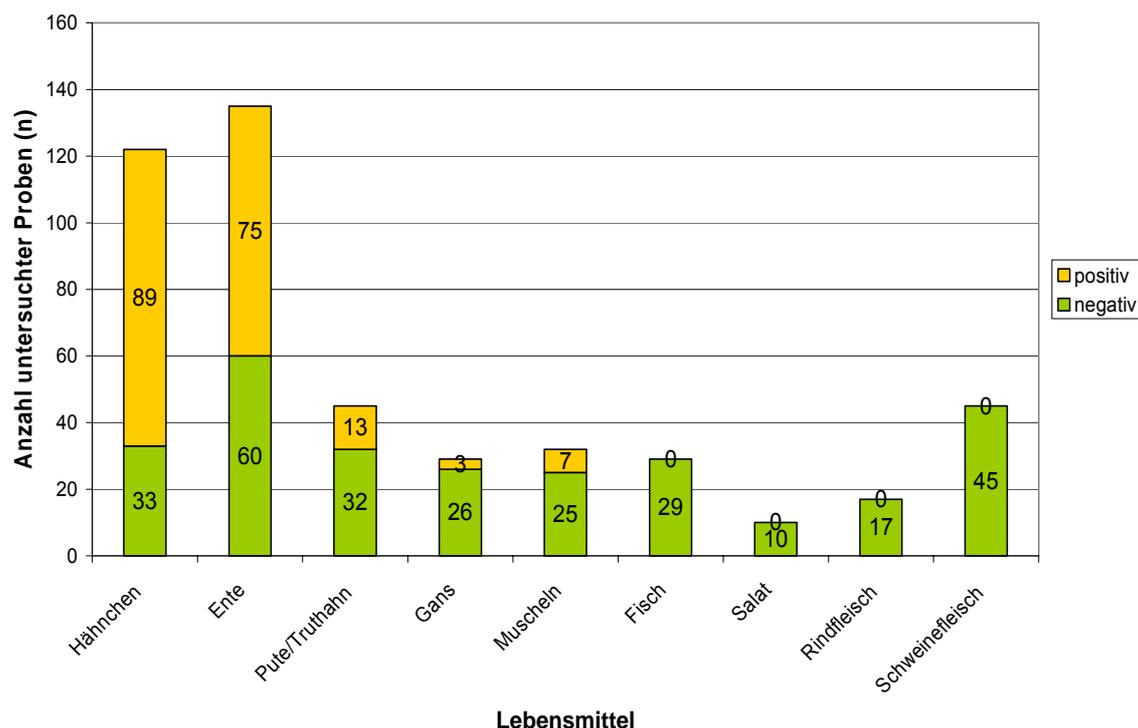


Abbildung 13 Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. mittels konventioneller Diagnostik nach 48 Stunden Voranreicherung

Die konventionelle Diagnostik ergab bei den 464 untersuchten Proben insgesamt bei 187 (40,3%) ein positives Ergebnis für den Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp.. Bei den untersuchten Geflügelproben waren 73,0% der 122 Hähnchenproben, 55,6% der 135 Entenproben, 28,9% der 45 Puten- bzw. Truthahnproben und 10,3% der 29 Gänseproben

Campylobacter-positiv. Bei den 32 Muschelproben ergaben 21,9% ein positives Ergebnis. Dabei waren nur Proben von Miesmuscheln *Campylobacter*-positiv, während die Austernproben (n=9) negativ waren. Bei einer Austernprobe ergab die Untersuchung mit dem MiniVIDAS® (BioMérieux) zwar ein positives Ergebnis, der Keim konnte jedoch nicht aus der Probe isoliert werden. Bei der Untersuchung der 29 Fisch-, 17 Rind-, 45 Schweinefleisch- und zehn Blattsalatproben wurden mittels konventioneller Diagnostik in keiner Probe thermophile *Campylobacter* spp. nachgewiesen.

Mit dem api® Campy-Testkit (BioMérieux) zur Identifizierung der Spezies wurden bei den positiven Hähnchenproben 70,8% als *C. jejuni* und 28,1% als *C. coli* bestimmt. Aus einer Probe konnte sowohl *C. jejuni* als auch *C. coli* aufgrund ihrer unterschiedlichen Koloniemorphologie auf der Blutplatte isoliert werden. Der Anteil von *C. jejuni* betrug bei den positiven Entenproben 58,7% gegenüber 37,3% von *C. coli*. Bei den Entenproben konnten außerdem bei zwei Proben *C. lari* und bei einer Probe *C. jejuni* und *C. lari* identifiziert werden. Die Isolate aus den Puten- bzw. Truthahnproben wurden zu 46,2% als *C. jejuni* und zu 53,8% als *C. coli* identifiziert. Bei den Gänseproben ergab die Speziesdifferenzierung für alle drei Isolate *C. jejuni*. Mit dem api® Campy-Testkit konnte bei fünf der sieben positiven Muschelproben die Spezies nicht eindeutig bestimmt werden. Bei einem Isolat wurde *C. lari* und bei einem Isolat *C. jejuni* identifiziert.

2.6.1.2. Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mittels Quadruplex real-time PCR

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Untersuchung der 464 Lebensmittelproben nach 48 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR hinsichtlich eines positiven oder negativen Nachweises für thermophile *Campylobacter* spp. dargestellt.

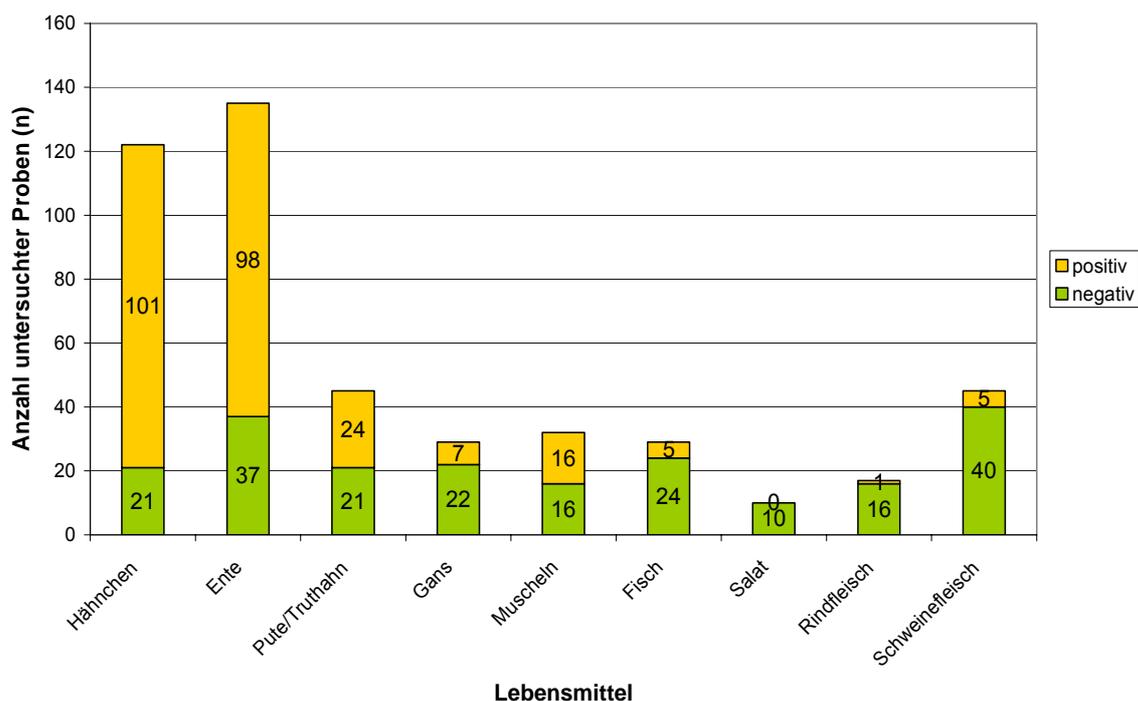


Abbildung 14 Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* oder *C. lari* mittels Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung

Mit der Quadruplex real-time PCR konnte bei den 464 untersuchten Proben insgesamt bei 257 (55,4%) ein positiver Nachweis für *C. jejuni*, *C. coli* oder *C. lari* erbacht werden. Von 122 Hähnchenproben waren 82,8%, von 135 Entenproben 72,6%, von 45 Puten- bzw. Truthahnproben 53,3% und von 29 Gänseproben 24,1% *Campylobacter*-positiv. 50,0% der 32 untersuchten Muschelproben lieferten ein positives Ergebnis. Darunter befand sich auch eine positive Austerprobe. Von den 29 untersuchten Fischproben konnte bei fünf ein positives Signal detektiert werden. Allerdings handelte es sich dabei um schwach positive Signale mit Ct-Werten von über 35. Auch bei den 17 Rind- und 45 Schweinefleischproben lieferten eine Rindfleischprobe und fünf Schweinefleischproben schwach positive Signale mit Ct-Werten von über 38. Bei den zehn Blattsalatproben wurden auch mit der Quadruplex real-time PCR in keiner Probe thermophile *Campylobacter* spp. nachgewiesen.

Eine Übersicht über die identifizierten Spezies bei der Untersuchung der Lebensmittel-Voranreicherungen mit der Quadruplex real-time PCR gibt Tabelle 45.

Tabelle 45 Identifizierte Spezies bei der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 48 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR

Detektierte Spezies	Probenart						
	Hähnchen	Ente	Pute / Truthahn	Gans	Muscheln	Fisch	Rind- und Schweinefleisch
<i>C. jejuni</i>	67 (66,3%)	44 (44,9%)	14 (58,3%)	7 (100%)	3 (18,8%)	2 (40%)	6 (100%)
<i>C. coli</i>	4 (4%)	11 (11,2%)	7 (29,2%)	0	0	1 (20%)	0
<i>C. lari</i>	0	1 (1%)	0	0	12 (75%)	1 (20%)	0
<i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	30 (29,7%)	39 (39,8%)	3 (12,5%)	0	0	0	0
<i>C. jejuni</i> und <i>C. lari</i>	0	3 (3,1%)	0	0	1 (6,3%)	1 (20%)	0
Insgesamt positive Proben	101	98	24	7	16	5	6

Bei den Geflügelproben wurde somit am häufigsten *C. jejuni* mit 66,3% bei Hähnchen, 44,9% bei Ente, 58,3% bei Pute bzw. Truthahn und 100% bei Gans nachgewiesen. *C. coli* trat vor allem bei Ente und Hähnchen häufig zusammen mit *C. jejuni* auf (39,8% und 29,7%). Auch bei Pute bzw. Truthahn war diese Mischinfektion bei 12,5% der positiven Proben nachweisbar, wobei hier auch in 29,2% der positiven Proben ausschließlich *C. coli* nachweisbar war. Bei den Entenproben wurde bei einer Probe *C. lari* und bei drei Proben eine Mischinfektion mit *C. jejuni* und *C. lari* detektiert. Insgesamt betrug der Anteil von Mischinfektionen bei den positiven Geflügelproben 32,6%. Bei den Muschelproben wurde bei 75,0% der positiven Proben *C. lari* identifiziert. Bei drei Proben lieferte die Quadruplex real-time PCR für *C. jejuni* und bei einer Probe für *C. jejuni* sowie *C. lari* ein positives Signal. Bei den Fischproben wurden sowohl *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mit schwach positiven Signalen detektiert, während bei Rind- und Schweinefleisch nur *C. jejuni* nachgewiesen wurde.

**2.6.2. Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden
Voranreicherung mittels Quadruplex real-time PCR**

147 Proben wurden parallel zur konventionellen Diagnostik und zur Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden bereits nach 24 Stunden Voranreicherung mittels Quadruplex real-time PCR untersucht. Es handelte sich um 107 Geflügel-, zwölf Muschel-, 16 Schweinefleisch- und neun Rindfleischproben sowie zwei Fischproben und eine Salatprobe. Insgesamt waren 44,9% der untersuchten Proben nach 24 Stunden Voranreicherung *Campylobacter*-positiv. Untergliedert nach den verschiedenen Lebensmittelarten ergaben 38 (76,0%) der 50 Hähnchenproben, 18 (60,0%) der 30 Entenproben und acht (44,4%) der 18 Puten- bzw. Truthahnproben ein positives Ergebnis. Von den untersuchten neun Gänseproben und den 16 Schweinefleischproben war jeweils eine Probe positiv, während die untersuchten Muschel-, Rindfleisch-, Fisch- und Salatproben negativ waren. Die detektierten Spezies sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 46 Identifizierte Spezies bei der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR

Detektierte Spezies	Probenart				
	Hähnchen	Ente	Pute / Truthahn	Gans	Schweinefleisch
<i>C. jejuni</i>	31 (81,6%)	11(61,1%)	6 (75,0%)	1(100%)	1 (100%)
<i>C. coli</i>	0	2 (11,1%)	1(12,5%)	0	0
<i>C. jejuni</i> und <i>C. coli</i>	7 (18,4%)	5 (27,8%)	1 (12,5%)	0	0
Insgesamt positive Proben	38	18	8	1	1

Somit wurde nach 24 Stunden Voranreicherung bei den positiven Proben am häufigsten *C. jejuni* mit 81,6% bei Hähnchen, 61,1% bei Ente und 75,0% bei Pute bzw. Truthahn nachgewiesen. Mischinfektionen mit *C. jejuni* und *C. coli* traten bei 20,0% der positiven Geflügelproben auf.

2.6.3. Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden

2.6.3.1. Konventionelle Diagnostik und Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung

In Tabelle 47 ist die Anzahl der positiven Ergebnisse bei der Untersuchung der verschiedenen Lebensmittel auf thermophile *Campylobacter* spp. mit der konventionellen Diagnostik und der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung gegenüber gestellt.

Tabelle 47 Anteil *Campylobacter*-positiver Proben bei der Untersuchung von Lebensmitteln mit der konventionellen Diagnostik und der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung

Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Positiv mit konventioneller Diagnostik	Positiv mit Quadruplex real-time PCR
Hähnchen	122	89 (73,0%)	101 (82,8%)
Ente	135	75 (55,6%)	98 (72,6%)
Pute / Truthahn	45	13 (28,9%)	24 (53,3%)
Gans	29	3 (10,3%)	7 (24,1%)
Muscheln	32	7 (21,9%)	16 (50,0%)
Fisch	29	0	5 (17,2%)
Rindfleisch	17	0	1 (5,9%)
Schweinefleisch	45	0	5 (11,1%)
Salat	10	0	0
Insgesamt	464	187 (40,3%)	257 (55,4%)

Mit der Quadruplex real-time PCR wurden mit 55,4% insgesamt mehr *Campylobacter*-positive Proben detektiert als mit der konventionellen Diagnostik (40,3%). Bei den Geflügelproben wurde mit beiden Methoden die höchste Prävalenz bei Hähnchen ermittelt (73% mit der konventionellen Diagnostik und 82,8% mit der Quadruplex real-time PCR). Die zweithöchsten Positivraten (55,6% und 72,6%) wurden jeweils bei Ente erzielt. Bei Pute bzw. Truthahn und Gans wurden jeweils niedrigere Anteile positiver Proben nachgewiesen, wobei mit der Quadruplex real-time PCR bei beiden Geflügelarten etwa doppelt so viel positive Nachweise wie mit der konventionellen Diagnostik erbracht wurden (53,3% gegenüber 29,8% bei Pute bzw. Truthahn und 24,1% gegenüber 10,3% bei Gans). Auch bei den Muschelproben wurden mit der Quadruplex real-time PCR mit einem Wert von 50,0% weitaus mehr positive Proben detektiert als mit der konventionellen Diagnostik (21,9%). Während bei den Produktgruppen Fisch, Rind- und Schweinefleisch mit der konventionellen

Diagnostik bei keiner Probe thermophile *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden, konnten mit der Quadruplex real-time PCR bei einzelnen Proben schwach positive Signale detektiert werden, die zu Prävalenzen von 17,2% bei Fisch, 5,9% bei Rindfleisch und 11,1% bei Schweinefleisch führten.

Insgesamt wurden alle Proben, die mit der konventionellen Diagnostik ein positives Ergebnis lieferten, auch mit der Quadruplex real-time PCR erfasst. Proben, die ausschließlich bei der Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR ein positives Signal lieferten, hatten in der Regel hohe Ct-Werte, die auf eine schwache Kontamination der Proben mit *C. jejuni*, *C. coli* oder *C. lari* hinweisen. So betrug der Mittelwert der Ct-Werte von Proben, die auch mit der konventionellen Diagnostik positiv waren (n=187) 22,9 mit einer Standardabweichung von 4,2, während der Mittelwert der Proben, die nur mit der real-time PCR positiv waren (n=70) bei 35,5 mit einer Standardabweichung von 5,3 lag. Unter den Proben, die nur mit der real-time PCR als *Campylobacter*-positiv detektiert wurden, waren auch sechs Proben, die mit Ct-Werten von 20,1, 26,4 (2 Proben), 23,3, 21,7 und 24,0 deutlich positive Signale lieferten. Dabei fiel auf, dass vier dieser Proben auch bei der Untersuchung mit dem MiniVIDAS® (BioMérieux) positiv waren, ungewöhnlicherweise jedoch keine Isolierung der Keime möglich war.

Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit der Quadruplex real-time PCR mit der konventionellen Diagnostik als Referenzmethode wurden die unter C.2.8 beschriebenen Validierungskriterien berechnet. Dabei wurde das Auswertungsschema in Tabelle 23 zugrunde gelegt.

Tabelle 48 Auswertungsschema zur Berechnung der Validierungsparameter zum Methodenvergleich von Quadruplex real-time PCR und kulturellem Verfahren als Referenzverfahren

		Quadruplex real-time PCR		
		positiv	negativ	Summe
Kulturelles Verfahren	positiv	187	0	187
	negativ	70	207	277
Summe		257	207	464

Damit ergab sich eine Spezifität von 74,7%, was bedeutet, dass dieser Prozentsatz der mit dem kulturellen Verfahren negativen Proben auch mit der Quadruplex real-time PCR als negativ erkannt wurde. Die Sensitivität von 100% drückt aus, dass alle als sicher positiv erkannten Proben auch mit der Quadruplex real-time PCR positiv waren. Die relative Richtigkeit als Maß für die Anzahl übereinstimmender Ergebnisse beider Methoden betrug 84,9%. Es wurde eine Falsch-Positiv-Rate von 25,3% und eine Falsch-Negativ-Rate von 0% ermittelt. Der Konkordanzindex Kappa betrug 0,7, was zwar für eine starke statistische Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden spricht, jedoch die Leistungsfähigkeit der

Quadruplex real-time PCR zunächst als „ungenügend“ im Vergleich zur Referenzmethode einstuft. Dieses Ergebnis ergibt sich durch den hohen Anteil der Proben, die mit der Quadruplex real-time PCR positiv waren, mit der konventionellen Diagnostik jedoch negativ. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden Nachweismethoden ergaben sich letztendlich nur dadurch, dass mit der Quadruplex real-time PCR ein sensitiverer Nachweis im Vergleich zum kulturellen Verfahren möglich ist.

Die Ergebnisse der beiden Methoden hinsichtlich Speziesidentifizierung sind für die Geflügelarten Hähnchen, Ente und Pute bzw. Truthahn in Abbildung 15 veranschaulicht.

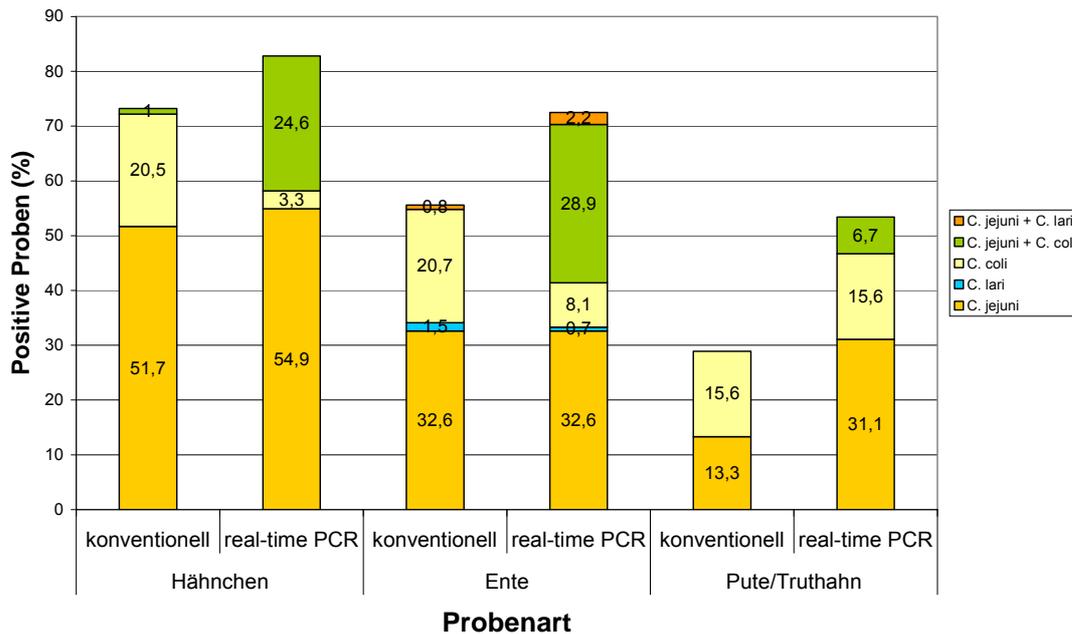


Abbildung 15 Isolierte bzw. detektierte *Campylobacter* Spezies bei der Untersuchung von Lebensmittelproben mit der konventionellen Diagnostik und der Quadruplex real-time PCR

Aus Abbildung 15 geht hervor, dass neben den höheren Positivraten, die bei der Untersuchung der Proben mit der Quadruplex real-time PCR erzielt wurden, auch die identifizierten Spezies zum Teil voneinander abwichen. Die Abweichungen ergaben sich vor allem dadurch, dass mit der Quadruplex real-time PCR bei einem Teil der Proben Mischinfektionen mit zwei verschiedenen *Campylobacter* spp. detektiert wurden, während bei der konventionellen Diagnostik aufgrund der gleichen Koloniemorphologie der verschiedenen Spezies auf Blutagar in der Regel nur eine bakterielle Kolonie biochemisch differenziert wurde. Bei den Hähnchenproben war auffällig, dass hauptsächlich bei den Proben, aus denen mit der konventionellen Diagnostik *C. coli* isoliert wurde, auch *C. jejuni* mit in der Regel höheren Ct-Werten als *C. coli* detektierbar war. Bei den Entenproben wurden aus den Proben mit Mischinfektionen etwa gleichermaßen *C. jejuni* oder *C. coli*

isoliert. Hier war der Zusammenhang zwischen niedrigerem Ct-Wert und isolierter Spezies nicht erkennbar. Mit der real-time PCR wurde bei drei Puten- bzw. Truthahnproben eine Mischinfektion detektiert. Davon konnte mittels konventioneller Diagnostik bei einer Probe kein Isolat gewonnen werden und bei den anderen beiden konnte jeweils nur *C. jejuni* bzw. *C. coli* isoliert werden.

Bei Hähnchen-, Enten- und Puten- bzw. Truthahnproben, bei denen mit der real-time PCR auch nur eine Spezies detektiert wurde, stimmten die Ergebnisse mit dem kulturellen Verfahren mit Ausnahme einer Probe (Kultur: *C. coli*; PCR: *C. jejuni*) vollständig überein.

Die Speziesidentifizierung bei drei Gänseproben, die mit beiden Methoden positiv waren, ergab übereinstimmend *C. jejuni*.

Fünf der mit der konventionellen Diagnostik isolierten Stämme aus Muschelproben konnten mit dem api[®] Campy-Testkit nicht eindeutig bestimmt werden, während mit der real-time PCR *C. lari* detektiert wurde. Bei einem Muschelisolat wurde übereinstimmend *C. lari* identifiziert und bei einem ergab der api[®] Campy-Testkit *C. jejuni*, die real-time PCR jedoch *C. lari*.

2.6.3.2. Quadruplex real-time PCR nach 24 Stunden Voranreicherung gegenüber konventioneller Diagnostik und Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung

Von den 147 Proben, die zusätzlich auch nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR untersucht wurden, waren 66 *Campylobacter*-positiv und 81 negativ. Bei diesen Proben konnte mit der konventionellen Diagnostik bei 51 *Campylobacter* spp. isoliert werden, während 96 negativ waren. Diskrepanzen zwischen den beiden Untersuchungsverfahren traten bei insgesamt 20 Proben auf. 16 Proben lieferten nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR positive Signale, es konnte aber kein Isolat gewonnen werden. Bei drei Proben wurde mit der real-time PCR nach 24 Stunden *C. jejuni* detektiert, nach 48 Stunden allerdings mit dem kulturellen Verfahren *C. coli* isoliert. Bei einer Muschelprobe, bei der *C. lari* isoliert wurde, konnte nach 24 Stunden Voranreicherung bei der Untersuchung mit der real-time PCR kein Nachweis erbracht werden. Unabhängig von der Spezies wurden somit 98% der kulturell positiven Proben bereits nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR detektiert. Mit der Quadruplex real-time PCR nach 48 Stunden Voranreicherung waren 78 der 147 untersuchten Proben positiv. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen der Untersuchung nach 24 und nach 48 Stunden Voranreicherung lieferten drei Proben, die nach 24 Stunden mit Ct-Werten von 36,9, 42,6 und 39,9 positiv waren, nach 48 Stunden aber kein positives Signal mehr lieferten. Diese drei Proben waren auch kulturell negativ. Bei drei Proben wurde nach 24 Stunden nur *C. jejuni* detektiert, während nach 48 Stunden eine Mischinfektion mit *C.*

jejuni und *C. coli* nachgewiesen werden konnte. Bei 15 Proben konnte erst nach 48 Stunden ein positiver *Campylobacter*-Nachweis erbracht werden. Dabei handelte es sich um zwei Muschelproben, die *C. lari* positiv waren (Ct-Werte: 26,7 und 21,7). Außerdem wurden eine *C. coli*-positive und zwölf *C. jejuni*-positive Proben nach 24 Stunden noch nicht detektiert. Von diesen Proben hatten bis auf die *C. coli*-positive und eine *C. jejuni*-positive Probe mit Ct-Werten von 31,0 und 31,7 alle hohe Ct-Werte zwischen 34,4 und 42,6. Insgesamt wurden 80,8% der Proben, die nach 48 Stunden Voranreicherung bei der Untersuchung mit der Quadruplex real-time PCR positiv waren, bereits auch nach 24 Stunden erfasst.

3. Untersuchung von Isolaten aus Lebensmitteln

Mit der Quadruplex real-time PCR wurden insgesamt 201 Isolate aus Lebensmittelproben, die aus der Routinediagnostik des LGL stammten und im Rahmen der konventionellen Diagnostik auf Speziesebene bestimmt wurden, untersucht. Davon waren 82 Isolate aus Hähnchen-, 77 aus Enten-, 13 aus Puten- bzw. Truthahn-, drei aus Gänse- und 26 aus Muschelproben.

3.1. Identifizierung von *Campylobacter* spp. mittels konventioneller Diagnostik

Zur Identifizierung der isolierten Stämme wurde bei der konventionellen Diagnostik das api[®] Campy-Testkit (BioMérieux) verwendet, bei dem die Differenzierung aufgrund von biochemischen Reaktionen erfolgt. Die Ergebnisse der Untersuchung der insgesamt 201 Isolate aus Lebensmittelproben sind in Tabelle 49 dargestellt.

Tabelle 49 Identifizierte *Campylobacter* Spezies von Isolaten aus Lebensmittelproben mit dem api® Campy-Testkit

Spezies	Ursprung des Isolates (Lebensmittel)				
	Hähnchen	Ente	Pute/Truthahn	Gans	Muscheln
<i>C. jejuni</i>	55 (67,1%)	44 (57,1%)	6 (46,2%)	3 (100%)	1 (3,8%)
<i>C. coli</i>	27 (32,9%)	29 (37,7%)	7 (53,8%)	-	-
<i>C. lari</i>	-	3 (3,9%)	-	-	14 (53,8%)
Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.	-	1 (1,3%)	-	-	11 (42,3%)
Insgesamt	82	77	13	3	26

Bei den Geflügelproben wurde mit dem api® Campy-Testkit am häufigsten *C. jejuni* mit insgesamt 61,7% identifiziert. Der Anteil von *C. coli* bei den Isolaten aus Geflügelproben betrug 36,0%. Vor allem bei den Hähnchenproben trat *C. jejuni* mit 67,1% viel häufiger als *C. coli* mit 32,9% auf. Bei den Isolaten aus Entenproben konnte bei drei Proben auch *C. lari* identifiziert werden.

Von den 26 Muschelproben wurde die Mehrheit (53,8%) als *C. lari* bestimmt. Bei elf Isolaten war keine eindeutige Zuordnung zu einer Spezies möglich (thermophile *Campylobacter* spp.). Bei einem Isolat identifizierte das api® Campy-Testkit *C. jejuni*.

3.2. Identifizierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* mittels Quadruplex real-time PCR

Die mit der Quadruplex real-time PCR identifizierten *Campylobacter* Spezies bei der Untersuchung der Isolate aus Lebensmitteln sind in Tabelle 47 aufgeführt.

Tabelle 50 Identifizierte *Campylobacter* Spezies von Isolaten aus Lebensmittelproben mit der Quadruplex real-time PCR

Spezies	Ursprung des Isolates (Lebensmittel)				
	Hähnchen	Ente	Pute/Truthahn	Gans	Muscheln
<i>C. jejuni</i>	55 (67,1%)	33 (42,9%)	6 (46,2%)	3 (100%)	-
<i>C. coli</i>	27 (32,9%)	40 (51,9%)	7 (53,8%)	-	-
<i>C. lari</i>	-	4 (5,2%)	-	-	26 (100%)
Insgesamt	82	77	13	3	26

Mit der Quadruplex real-time PCR wurden bei den Geflügelproben insgesamt 55,4% der Isolate als *C. jejuni* und 42,3% der Isolate als *C. coli* identifiziert. Bei den Hähnchenproben überwog der Anteil von *C. jejuni* deutlich mit 67,1% gegenüber dem von *C. coli* mit 32,9%.

jeweils dieselben Spezies identifiziert. Bei den Muschelproben konnten elf Isolate (42,3%) mit dem api[®] Campy nicht differenziert werden, während mit der real-time PCR *C. lari* bestimmt wurde. Bei 14 Proben (53,8%) stimmte das Ergebnis überein und bei einer Probe ergab der api[®] Campy *C. jejuni*, die real-time PCR jedoch *C. lari*. Insgesamt ergaben die beiden Methoden in 88,1% der Fälle übereinstimmende Ergebnisse.

3.4. Sequenzierung von Isolaten von *Campylobacter* spp. zur Bestätigung der Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR

Bei Isolaten von *Campylobacter* spp., bei denen die Speziesidentifizierung mit der konventionellen Diagnostik ein anderes Ergebnis lieferte als die Quadruplex real-time PCR, wurde zur Verifizierung des Ergebnisses eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

13 Isolate, die mit der Quadruplex real-time PCR als *C. lari* identifiziert wurden, wurden auf einem Abschnitt der 16S rDNA sequenziert. Dieser DNA-Abschnitt wurde gewählt, weil für die 16S rDNA Sequenzen von *C. lari* in der Gendatenbank BLAST veröffentlicht sind und damit eine eindeutige Bestimmung der Spezies möglich ist.

Elf Isolate, bei denen sich die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR und der konventionellen Diagnostik dadurch unterschieden, dass mit der PCR *C. coli* und mit dem api[®] Campy *C. jejuni* identifiziert wurde, wurden zur eindeutigen Bestimmung auf einem DNA-Abschnitt der Gyrase mit den zur Entwicklung des *C. lari*-Nachweissystems entwickelten Primern (siehe 1.2), sequenziert. Dieser DNA-Abschnitt wurde gewählt, weil *C. jejuni* und *C. coli* anhand der Sequenz der 16S rDNA, die mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern amplifiziert wird, nicht eindeutig unterscheidbar sind, während das Alignment der Sequenzen für die Gyrase von *C. jejuni* und *C. coli* gezeigt hatte, dass die beiden Spezies auf diesem Gen eindeutige Unterschiede aufweisen.

Zur Identifizierung der Spezies wurden die erhaltenen Sequenzen mit den veröffentlichten Sequenzen in der Gendatenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 51 aufgeführt.

Tabelle 51 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung ausgewählter *Campylobacter*-Stämme

Isolat (Ergebnis konv. Diagnostik / real-time PCR)	Gen für Sequenzierung eines DNA-Abschnittes	Ergebnis der Sequenzierung mit bester Übereinstimmung		
		Beschreibung; Zugangsnummer	Anzahl sequenzierter Basen	Homologie
PM20142/98 (<i>C. spp.* / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> gene for 16S ribosomal RNA, strain: 89049; AB181365	541	99%
PM1266/99 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	656	99%
PM1351/99 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	650	99%
PM1742/99 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	582	99%
PM3052/99 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550632	587	99%
PM1506/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> genes for 16S rRNA, ITS region and 23S rRNA, partial and complete sequence, strain: CF89-12; AB066098	727	99%
PM1508/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	557	100%
PM3003/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	557	100%
PM3144/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	557	99%
PM3735/07 (<i>C. jejuni / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	625	99%
PM4405/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> gene for 16S ribosomal RNA, strain: 92251; AB181366	712	99%

ERGEBNISSE

PG8203-2/07 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> genes for 16S rRNA, ITS region and 23S rRNA, partial and complete sequence, strain: CF89-12; AB066098	659	99%
PM4272/99 (<i>C. spp. / C. lari</i>)	16S rRNA	<i>Campylobacter lari</i> strain LMG 11760 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; AF550633	651	99%
PG725/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	290	99%
PG770/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	295	99%
PG2129/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	293	99%
PG3584/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	147	98%
PG3929/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	269	99%
PG4011/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	290	99%
PG4437/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	292	100%
PG6312/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	292	100%
PG8612/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	233	98%
PG20873/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	214	98%
G1278/07 (<i>C. jejuni / C. coli</i>)	<i>gyrA</i>	<i>Campylobacter coli</i> DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene, partial cds; AF092101	63	100%

* Thermophile *Campylobacter* spp.

Die DNA-Sequenzierung von Isolaten mit unterschiedlichen Ergebnissen bei der Speziesidentifizierung zwischen der konventionellen Diagnostik und der Quadruplex real-time PCR bestätigte bei allen Proben das Ergebnis der Quadruplex real-time PCR.

4. Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR-Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

4.1. Nachweissystem nach Josefsen *et al.* (2004) basierend auf der 16S rDNA

4.1.1. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 48 Stunden Voranreicherung

Das Gesamtergebnis der Untersuchung von insgesamt 206 Lebensmittelproben aus der Routinediagnostik des LGL nach 48-stündiger Voranreicherung mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) parallel zur Quadruplex real-time PCR ist in Tabelle 52 dargestellt. Da mit der 16S rDNA real-time PCR die verschiedenen Spezies von *Campylobacter* gemeinsam erfasst werden, wurden positive Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR ebenso nicht nach identifizierter Spezies aufgeschlüsselt.

Tabelle 52 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR und der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) für die Untersuchung der Proben nach 48 Stunden Voranreicherung

		Quadruplex real-time PCR		
		positiv	negativ	Summe
16S rDNA real-time PCR nach Josefsen <i>et al.</i> (2004)	positiv	139	5	144
	negativ	2	60	62
	Summe	141	65	206

Damit waren insgesamt 68,4% der 206 untersuchten Lebensmittelproben mit der Quadruplex real-time PCR und 69,9% mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) *Campylobacter*-positiv. Mit der 16S rDNA real-time PCR wurden insgesamt drei Proben mehr als positiv detektiert als mit der Quadruplex real-time PCR. Untergliedert nach den verschiedenen Probenarten war bei den 156 Geflügelproben mittels Quadruplex real-time PCR eine Probe mehr positiv als mit der 16S rDNA real-time PCR (75,0% gegenüber 74,4% positive Proben). Diese Probe war mit der Quadruplex real-time PCR schwach positiv (Ct-Wert = 41,2). Bei der Untersuchung von 30 Muschelproben traten fünf diskrepante Ergebnisse zwischen den beiden Nachweissystemen auf. Insgesamt wurden mit der Quadruplex real-time PCR 53,3% und mit der 16S rDNA real-time PCR 63,3% der untersuchten Muschelproben als *Campylobacter*-positiv detektiert. Davon wurde eine schwach positive Probe (Ct-Wert = 41,7) nur mit der Quadruplex real-time PCR als *Campylobacter*-positiv detektiert, während vier Proben nur mit der 16S rDNA real-time PCR *Campylobacter*-positiv waren. Es handelte sich auch bei diesen Proben jeweils um schwach positive Proben (Ct-

Werte = 38,7 (2 Proben), 39,5 und 39,6). Die Untersuchung von 19 Fischproben mittels 16S rDNA real-time PCR bestätigte das schwach positive Ergebnis der Quadruplex real-time PCR von fünf der untersuchten Proben, bei denen mittels konventioneller Diagnostik keine thermophilen *Campylobacter* spp. nachgewiesen wurden und lieferte bei einer weiteren Probe ein positives Ergebnis. Die untersuchte Salatprobe war mit beiden Nachweissystemen negativ.

Somit stimmten die Ergebnisse der beiden real-time PCR-Methoden zu 96,6% überein. Diskrepanzen traten nur bei schwach positiven Proben auf, die mit der konventionellen Diagnostik alle *Campylobacter*-negativ waren.

4.1.2. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden Voranreicherung

Von 56 der 206 Lebensmittelproben, die nach 48-stündiger Voranreicherung mit einer der beiden real-time PCR-Methoden *Campylobacter*-positiv waren, wurden zusätzlich auch die Proben nach 24-stündiger Voranreicherung parallel zur Quadruplex real-time PCR mit der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) untersucht.

Davon wurden mit beiden Methoden übereinstimmend 48 Proben (85,7%) bereits nach 24-stündiger Bebrütung als *Campylobacter*-positiv detektiert. Bei einer Probe, die nach 48 Stunden Bebrütung mit beiden Methoden eindeutig als *Campylobacter*-positiv detektiert wurde, konnte nach 24-stündiger Voranreicherung nur mit der Quadruplex real-time PCR ein positives Ergebnis erbracht werden. Bei sieben Proben war mit beiden Methoden nach 24 Stunden Voranreicherung noch kein Nachweis von *Campylobacter* spp. möglich. Bei diesen Proben fiel auf, dass es sich entweder um schwach positive oder um *C. lari*-positive Proben handelte.

Die Ergebnisse der beiden real-time PCR Methoden bei der Untersuchung von Lebensmittelproben nach 24 Stunden Voranreicherung stimmten insgesamt zu 98,2% überein.

4.2. BAX[®] System (DuPont Qualicon)

4.2.1. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Lebensmittelproben

Es wurden 78 Lebensmittelproben aus der Routinediagnostik des LGL nach 48-stündiger Voranreicherung parallel zur Quadruplex real-time PCR mit dem BAX[®] System (DuPont Qualicon) untersucht.

Diese 78 Lebensmittelproben lassen sich in 65 Geflügelproben, zwölf Fischproben und in eine Salatprobe untergliedern. Tabelle 53 zeigt eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse der beiden Nachweismethoden.

Tabelle 53 Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR und des BAX[®] Systems (DuPont Qualicon) für die Untersuchung der Proben nach 48 Stunden Voranreicherung

		Quadruplex real-time PCR		
		positiv	negativ	Summe
BAX [®] System (DuPont Qualicon)	positiv	40	0	40
	negativ	5	33	38
	Summe	45	33	78

Die Quadruplex real-time PCR lieferte bei 57,7% der Proben ein positives Ergebnis für *Campylobacter* spp., während mit dem BAX[®] System 51,3% *Campylobacter*-positive Proben detektiert werden konnten.

Bei 73 der 78 Lebensmittelproben (93,6%) lag mit den beiden real-time PCR-Verfahren ein identisches Ergebnis hinsichtlich positivem oder negativem *Campylobacter*-Nachweis vor.

Fünf Proben wurden mit der Quadruplex PCR als *Campylobacter*-positiv detektiert, während mit dem BAX[®] System bei diesen Proben der Nachweis von *Campylobacter* spp. nicht möglich war. Die Ct-Werte der Proben lagen zwischen 32,7 und 42,2, was auf eine schwache Kontamination mit *Campylobacter* spp. hindeutet. Bei diesen Proben war konventionell auch keine Keimisolierung möglich.

Mit dem BAX[®] System ist wie auch mit der Quadruplex real-time PCR eine Identifizierung auf Speziesebene möglich. Übereinstimmend wurde mit beiden Verfahren bei 21 Proben eine Mischinfektion mit *C. jejuni* und *C. coli*, bei elf Proben *C. jejuni* und bei fünf Proben *C. coli* detektiert. Mittels Quadruplex real-time PCR konnte bei drei Proben eine Mischinfektion aufgezeigt werden, bei denen mit dem BAX[®] System bei zwei dieser Proben nur *C. jejuni* und bei einer nur *C. coli* identifiziert wurde.

4.2.2. Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Isolaten aus Lebensmitteln

Mit dem BAX[®] System wurden 70 Isolate aus Lebensmitteln aus der Routinediagnostik des LGL parallel zur Quadruplex real-time PCR untersucht. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden real-time PCR-Methoden ist nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 54 Ergebnisse der Untersuchung von Isolaten mit der Quadruplex real-time PCR und dem BAX[®] System

Ursprung (Lebensmittel)	Anzahl	Quadruplex real-time PCR	BAX [®] System (DuPont Qualicon)
Geflügel	44	15 x <i>C. jejuni</i>	14 x <i>C. jejuni</i>
		27 x <i>C. coli</i>	27 x <i>C. coli</i>
		2 x <i>C. lari</i>	2 x <i>C. lari</i>
			1 x kein Nachweis möglich
Muscheln	26	26 x <i>C. lari</i>	2 x <i>C. lari</i>
			24 x kein Nachweis möglich

Bei den untersuchten Geflügelproben waren die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR und des BAX[®] Systems bis auf ein Isolat identisch. Dieses Isolat wurde mittels Quadruplex PCR als *C. jejuni* differenziert, hingegen war mittels BAX[®] System kein Nachweis möglich. Somit stimmten Quadruplex real-time PCR und BAX[®] System bei den Geflügelproben zu 97,7% überein.

Von den insgesamt 26 Muschelisolaten konnten mit der Quadruplex real-time PCR alle 26 Isolate als *C. lari* identifiziert werden. Bei der Detektion mit dem BAX[®] System war in 24 Fällen keine Zuordnung möglich. Zwei Isolate konnten als *C. lari* identifiziert werden. Die Übereinstimmung der zwei Nachweismethoden für die Identifizierung der Isolate aus Muscheln lag damit nur bei nur 7,7%.

Da die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR bei Diskrepanzen zur konventionellen Diagnostik mittels Sequenzierung verifiziert wurden (siehe 3.4), wird deutlich, dass das BAX[®] System Unzulänglichkeiten beim Nachweis von *C. lari* insbesondere aus Muschelproben aufweist.

E. Diskussion

Da thermophile *Campylobacter* spp. als Erreger lebensmittelassoziierter Darminfektionen in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung erlangt haben, sind zuverlässige und schnelle Nachweisverfahren dieser Mikroorganismen in Lebensmitteln unerlässlich. Der kulturelle Nachweis nach ISO 10272:2006 nimmt allerdings von der bakteriellen Voranreicherung bis zur Speziesidentifizierung bis zu acht Tage in Anspruch.

Um ein zuverlässiges Ergebnis innerhalb weniger Stunden nach kultureller Voranreicherung zu erhalten, war das Ziel dieser Arbeit, ein routinetaugliches real-time PCR-Verfahren zum parallelen Nachweis und zur Differenzierung der lebensmittelrelevanten Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* zu entwickeln. Dabei stellte die hohe inter- und intraspezifische genetische Divergenz und Rekombination von *Campylobacter* spp. eine besondere Herausforderung bei der Auswahl spezifischer Nachweissysteme dar. Nach der Kombination geeigneter Nachweissysteme für die drei verschiedenen Spezies sowie eines internen Amplifikationskontrollsystems wurde die Selektivität, Sensitivität, Effizienz, Präzision und Robustheit der Quadruplex real-time PCR bestimmt. Der Vergleich mit der konventionellen Diagnostik (kultureller Nachweis) erfolgte durch die Untersuchung von Feldproben. Außerdem wurden vergleichende Untersuchungen des entwickelten Nachweissystems mit zwei weiteren real-time PCR-Methoden zum Nachweis der drei *Campylobacter* Spezies anhand von Lebensmittelproben durchgeführt.

1. Multiplex real-time PCR zum gleichzeitigen Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

In der Literatur wurde bislang kein real-time PCR-Nachweissystem zur parallelen Detektion und Differenzierung der thermophilen *Campylobacter* Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* in Lebensmitteln veröffentlicht. Ein Grund hierfür könnte zum einen darin liegen, dass im Allgemeinen das Hauptaugenmerk auf *C. jejuni* gerichtet wird, der anteilmäßig am häufigsten als Verursacher von Darminfektionen auftritt. Daneben kommt *C. coli* die zweitwichtigste Bedeutung zu. So wurden neben *C. jejuni*-spezifischen Nachweissystemen (Cheng und Griffiths, 2003; Yang *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Debretson *et al.*, 2007) wenige real-time PCR-Nachweissysteme publiziert, die den parallelen Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* (Best *et al.*, 2003; La Gier *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007) erlauben. Zum anderen sind Multiplex real-time PCR-Methoden relativ aufwändig in ihrer Optimierung und setzen die Verfügbarkeit eines real-time PCR-Gerätes voraus, das über mehrere

Detektionskanäle für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verfügt. Bei *Campylobacter* ist zudem die Differenzierung verschiedener Spezies aufgrund der hohen Variabilität in der Sequenz vieler Zielgene schwierig. So stellten Lick *et al.* (2007) in ihrer Studie zum Vergleich verschiedener PCR-Nachweismethoden für *Campylobacter* spp. fest, dass bei der Untersuchung von insgesamt 65 Stämmen zwölf verschiedener *Campylobacter* Spezies manche als Spezies-spezifisch publizierten Nachweissysteme zum Teil unspezifisch mit „Non-Target“-Stämmen reagierten. Als Ursache hierfür wurde der hohe Grad an intra- und interspezifischer Rekombination angeführt. Diese Eigenschaft wurde auch bereits von mehreren Autoren bei der Untersuchung von *Campylobacter* spp. mittels molekularbiologischer Typisierungsmethoden beschrieben (Dingle *et al.*, 2001; Schouls *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde die Duplex real-time PCR Methode zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* nach Best *et al.* (2003) als Basis für die Entwicklung einer Multiplex real-time PCR zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* gewählt, mit der bei den Untersuchungen von Lick *et al.* (2007) sehr gute Ergebnisse hinsichtlich Spezifität (Inklusivität: 100%, Exklusivität: 97,9% für *C. jejuni* und 100% für *C. coli*) und Eignung für die PCR-Routinediagnostik erzielt wurden. Für das spezifische Nachweissystem für *C. lari*, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, diente die Gyrase Untereinheit A (*gyrA*) als Zielgen. Dieses Gen wurde ausgewählt, weil in Veröffentlichungen bereits *C. jejuni*-spezifische Nachweissysteme beschrieben wurden, die auf diesem Gen basieren, (Ragimbeau *et al.*, 1998; Iijima *et al.*, 2004; Menard *et al.*, 2005) und deshalb angenommen wurde, dass damit auch der spezifische Nachweis von *C. lari* möglich sein sollte. Der Grund für die Anlehnung an dem von Iijima *et al.* (2004) publizierten real-time PCR-System war die von Lick *et al.* (2007) gezeigte hohe Spezifität dieses Nachweissystems. Beim *gyrA*-Gen ist zu beachten, dass Mutationen auftreten können, die als Ursache für die Ciprofloxacin-Resistenz von Stämmen von *Campylobacter* spp. identifiziert wurden (Wang *et al.*, 1993; Taylor und Chau, 1997; Kinana *et al.*, 2006; Sonnevend *et al.*, 2006; Boonmar *et al.*, 2007). Als Hauptursache für eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin wird eine Mutation angesehen, die zu einem Austausch der Aminosäure Threonin durch Isoleucin an Position 86 des Proteins führt (Wang *et al.*, 1993; Kinana *et al.*, 2006; Sonnevend *et al.*, 2006). Bei der Entwicklung des *C. lari*-spezifischen Nachweissystems wurde daher auch darauf geachtet, dass es auf einen Abschnitt außerhalb der „quinolone resistance-determining region“ des *gyrA*-Gens abzielt.

Die Sequenzierung eines Abschnittes des *gyrA*-Gens von zwölf verschiedenen Stämmen von *C. lari* zeigte die Heterogenität dieser Spezies auf. Während acht Stämme eine identische Basensequenz hatten, wiesen drei Stämme größtenteils dieselben Unterschiede zu den anderen acht auf und bildeten damit eine Untergruppe. Die Sequenz eines Stammes wies wiederum Unterschiede zu allen anderen elf Stämmen auf. Zum Teil stimmten die

Basen, in denen sich die vier Stämme von der Mehrzahl der *C. lari*-Stämme unterschieden, mit den Basen von *C. jejuni* oder *C. coli* an dieser Stelle überein, was auf einen interspezifischen Austausch hindeuten könnte. Die Diversität von *C. lari* wurde bereits in anderen Studien beschrieben. Korczak *et al.* (2006) stellten bei der Sequenzierung eines Abschnittes der RNA Polymerase Untereinheit B (*rpoB*) ebenfalls fest, dass die Stämme von *C. lari* zwei verschiedene Cluster bildeten. Dabei handelte es sich zum einen um Urease-negative, Nalidixinsäure-resistente Stämme und zum anderen um Urease-positive, Nalidixinsäure-sensitive Stämme. Duim *et al.* (2004) unterschieden mittels AFLP-Analyse sogar vier verschiedene Genogruppen von *C. lari*. Dabei konnten die verschiedenen Gruppen allerdings nicht eindeutig nach den Kriterien Nalidixinsäure-resistent oder –sensitiv und Urease-positiv oder –negativ getrennt werden. Bei der Entwicklung des spezifischen Nachweissystems für *C. lari* konnten die Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen von *C. lari* durch die Konstruktion von zwei Primerpaaren nahezu vollständig berücksichtigt werden. Für die Sonde wurde für alle zwölf Stämme dieselbe Sequenz gewählt, da bei den vier Stämmen, die Unterschiede zu den anderen acht aufwiesen, jeweils nur eine einzelne Base unterschiedlich war.

2. Validierung der etablierten Quadruplex real-time PCR

Die Validierung einer neuen Nachweismethode ist für ihren Einsatz in der Routinediagnostik und für ihre Standardisierung unerlässlich. Ziel ist dabei, zu zeigen, dass die neue Methode vergleichbare oder bessere Ergebnisse als die aktuelle Referenzmethode liefert (Malorny *et al.*, 2003). Bei der Validierung der in dieser Arbeit etablierten Quadruplex real-time PCR wurden die Kriterien im Entwurf für die ISO-Norm „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Performance characteristics of molecular detection methods“ (ISO/DIS 22118) berücksichtigt.

Die **Selektivität** der drei *Campylobacter*-spezifischen Nachweissysteme wurde anhand von insgesamt 43 „Target“-Stämmen (18 *C. jejuni*-, 11 *C. coli*- und 14 *C. lari*-Stämme), 27 „Non-Target“-*Campylobacter*-Stämmen sowie 43 Stämmen anderer bakterieller Spezies getestet. Laut ISO/DIS 22118 sollen für die Inklusivitätstestung möglichst 50 Stämme des jeweiligen Zielorganismus untersucht werden. Dies wurde in dieser Arbeit durch die spätere Untersuchung von 201 verschiedenen Isolaten von *Campylobacter* spp. aus Lebensmittelproben erfüllt. Bei den zur Selektivitätsprüfung eingesetzten Stämmen konnte mit allen drei Nachweissystemen eine Inklusivität von 100% erzielt werden. Auch die Exklusivität betrug für das *C. coli*- und das *C. lari*-spezifische Nachweissystem 100%. Das *C. jejuni*-spezifische Nachweissystem detektierte allerdings drei Stämme von *C. lari* und zwei Stämme

von *C. fetus* ssp. *venerealis* mit schwach positiven Signalen und wies somit eine Exklusivität von 94,7% auf. Best *et al.* (2003) erhielten bei ihren Untersuchungen jedoch für das Nachweissystem für *C. jejuni* keine positiven Ergebnisse für andere *Campylobacter*-Stämme. Auffällig war, dass die Ct-Werte der unspezifisch detektierten Stämme zwischen 40 und 42 lagen, was deutlich über den Signalen der Stämme von *C. jejuni* mit Ct-Werten zwischen 19 und 25 lag. Da die untersuchten Stämme in gleichen und verhältnismäßig hohen Konzentrationen eingesetzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die fünf „Non-Target“-Stämme nur sehr schwach mit dem *C. jejuni*-spezifischen Nachweissystem amplifiziert wurden. Dennoch scheinen die Sequenzen dieser Stämme Ähnlichkeiten mit der Zielsequenz von *C. jejuni* aufzuweisen. Da nicht alle getesteten Stämme von *C. lari* und *C. fetus* diese Kreuzreaktion aufzeigten, könnte die Ursache hierfür in einem interspezifischen genetischen Austausch einzelner Stämme liegen. Mit Ausnahme dieser wenigen unspezifischen, schwach positiven Signale für *C. jejuni*, ist die etablierte Quadruplex real-time PCR aber aufgrund der ansonsten sehr zuverlässigen Ergebnisse der Selektivitätsprüfungen zum Nachweis und zur Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* geeignet. Bezüglich der **Nachweisgrenze** oder **Sensitivität** einer real-time PCR beziehen sich die Angaben oftmals auf unterschiedliche Schritte des Verfahrens. Die ISO/DIS 22118 fordert den Nachweis von 1-10 Zellen in 25 g Lebensmittel. Dabei wird das ganze Verfahren einschließlich Voranreicherung, Probenaufbereitung und real-time PCR betrachtet. Malorny *et al.* (2003) übertrugen diesen Wert in 10^3 – 10^4 Zellen pro ml vorangereicherter Probe bzw. in 10-100 Kopien der bakteriellen Ziel-DNA pro Reaktionsansatz. In Veröffentlichungen sind im Allgemeinen unterschiedliche Angaben zu finden. So bestimmten Sails *et al.* (2002) beispielsweise bei ihrer real-time PCR zum Nachweis von *C. jejuni* in Lebensmitteln eine Nachweisgrenze von ca. 12 Genomäquivalenten pro Reaktion. Cheng und Griffiths (2003) hingegen geben bei ihrer *C. jejuni*-spezifischen real-time PCR nach 12-stündiger Voranreicherung eine Nachweisgrenze von weniger als 10 KbE pro ml gespikter Hähnchenabschwemmung an. In dieser Arbeit wurde die Nachweisgrenze der etablierten Quadruplex real-time PCR auf allen verschiedenen Stufen des Verfahrens zum Nachweis von *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln ermittelt. Bezogen auf die DNA-Menge pro Reaktionsansatz war der Nachweis von 50 fg von *C. jejuni* und *C. lari* sowie von 500 fg von *C. coli* möglich. Umgerechnet in Genom-Kopien entspricht dies ca. 30 Kopien von *C. jejuni* und *C. lari* bzw. 300 Kopien von *C. coli*. Best *et al.* (2003) detektierten ca. 20 KbE von *C. jejuni* und *C. coli* pro Reaktionsansatz bei ihren Untersuchungen. Der Grund für die höhere Nachweisgrenze von *C. coli* bei der Quadruplex real-time PCR dürfte an der Markierung der *C. coli*-spezifischen Sonde mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY5 liegen. Dieser Farbstoff weist insgesamt eine schwächere Fluoreszenz auf und führt dadurch wohl auch zu Sensitivitätsverlusten bei der Analyse. Es ist eine Verschiebung der Ct-Werte um 2-4 Einheiten im

Vergleich zum Fluoreszenzfarbstoff FAM vorstellbar (Landt, persönliche Mitteilung). Eigene Untersuchungen zeigten auch, dass bei der Markierung der *C. coli*-spezifischen Sonde mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM ebenfalls die Detektion von 50 fg DNA von *C. coli* pro Reaktionsansatz möglich war. Die Möglichkeit, dass das *C. coli*-spezifische Nachweissystem durch die Kombination mit den drei weiteren Nachweissystemen im Vergleich zum Duplex-Ansatz nach Best *et al.* (2003) an Sensitivität verliert, kann durch die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zu Multiplex- und Duplex-Ansatz, die nachfolgend noch genauer diskutiert werden, ausgeschlossen werden.

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze einschließlich der DNA-Extraktion ergab sich bei sechs unabhängigen Versuchen eine Detektionswahrscheinlichkeit von 100% für *C. jejuni* bei einem Keimgehalt von mindestens $1,1 \times 10^3$ KbE/ml, für *C. coli* bei mindestens $8,9 \times 10^3$ KbE/ml und für *C. lari* bei mindestens $4,5 \times 10^2$ KbE/ml. Diese Werte liegen im Vergleich zu anderen real-time PCR-Nachweissystemen für pathogene Keime in Lebensmitteln in einem üblichen Bereich. So ermittelten Josefsen *et al.* (2004) für ihre real-time PCR auf Basis der 16S rDNA beispielsweise eine Detektionswahrscheinlichkeit von 100% für 4×10^3 KbE von *C. jejuni* pro ml Hähnchenabschwemmung. Malorny *et al.* (2004) wiesen mit ihrer Salmonellen-spezifischen real-time PCR 10^4 KbE/ml von *Salmonella* Thyphimurium mit 100%-iger Wahrscheinlichkeit nach. Die Angabe von Nachweisgrenzen sollte immer im Zusammenhang mit der Detektionswahrscheinlichkeit erfolgen, da die niedrigste Anzahl von Zellen, die mit einer real-time PCR detektiert werden kann, nicht unbedingt zu 100% reproduzierbar detektiert wird. So können inhibitorische Substanzen oder die Qualität der DNA die Sensitivität der real-time PCR beeinflussen (Josefsen *et al.*, 2004). Bei den hier ermittelten Nachweisgrenzen muss daher auch berücksichtigt werden, dass bei Lebensmittelproben im Vergleich zu den hier untersuchten Verdünnungsreihen aus Reinkulturen auch Matrixeffekte die DNA-Extraktion erschweren und einen negativen Einfluss auf den Ablauf der PCR aufgrund von Inhibition haben können, was zur Erhöhung der Nachweisgrenze führen kann (Wilson, 1997; Uyttendaele *et al.*, 1999). Wie bei den Versuchen zur artifiziellen Kontamination von Lebensmittelproben gezeigt wurde, erreichen auch Proben, die nur wenige Zellen von *Campylobacter* spp. enthalten, während einer 48-stündigen Voranreicherung Keimzahlen von mindestens 10^6 KbE/ml. Keimzahlen in dieser Größenordnung dürften trotz möglicher Matrixeffekte bei der ermittelten Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR von ca. 10^3 KbE/ml für die drei verschiedenen *Campylobacter* spp. nachweisbar sein.

Um auch die Voranreicherung sowie mögliche Matrixeffekte und Einflüsse der Hintergrundflora in Lebensmitteln zu berücksichtigen, wurde die Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR anhand von artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben bestimmt. Dabei war der Nachweis von 1-4 KbE von *C. jejuni* und 4-7 KbE von *C. coli* in 25 g

Hackfleisch und von 1-2 KbE von *C. lari* in 25 g Seelachs nach 48-stündiger Voranreicherung möglich. Damit ist die nach ISO geforderte Nachweisgrenze von 1-10 KbE pro 25 g Lebensmittelprobe für pathogene Keime erfüllt. Der Nachweis gelang trotz des Vorhandenseins einer insbesondere bei den untersuchten Hackfleischproben relativ hohen bakteriellen Hintergrundflora. Daran wird deutlich, dass die selektive Anreicherung von *Campylobacter* spp. in Prestonbouillon bei 42°C unter mikroaeroben Bedingungen sehr effektiv das Wachstum weniger Zellen von *Campylobacter* spp. begünstigt und die Begleitflora hemmt. Von den insgesamt neun Voranreicherungen, bei denen eine Keimzählung durchgeführt wurde, wiesen acht nach 48-stündiger Inkubation Keimzahlen zwischen 5×10^7 und 5×10^8 KbE/ml auf. Bei einer Probe (Nachweis von *C. coli*, Versuch 1) wurden nur 6×10^6 KbE/ml erreicht. Wenngleich sich die anderen Mikroorganismen in der selektiven Voranreicherung nicht vermehren können, muss berücksichtigt werden, dass trotzdem hohe Konzentrationen ihrer DNA in der Voranreicherung vorliegen. Der Nachweis von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* durch die spezifischen PCR-Nachweissysteme war dennoch reproduzierbar möglich. Auch bei Anwesenheit der jeweils beiden anderen Spezies von *Campylobacter* in der Voranreicherung konnten die oben genannten geringen Keimzahlen der drei Spezies nachgewiesen werden. Innerhalb der 48-stündigen Voranreicherung können auch wenige Zellen einer Spezies von *Campylobacter* trotz einer Überzahl von Zellen anderer *Campylobacter* Spezies eine Keimzahl erreichen, die mit dem jeweiligen spezifischen Nachweissystem sicher detektierbar ist. Nach nur 24 Stunden Voranreicherung war der Nachweis hingegen zum Teil noch nicht möglich. Es konnte bei allen Proben, bei denen nur Zellen einer einzelnen Spezies von *Campylobacter* zugegeben worden waren, bereits nach 24 Stunden Voranreicherung ein Nachweis erbracht werden. Bei Proben, die jedoch Keimgemische der drei *Campylobacter* Spezies enthielten, war die Detektion der zahlenmäßig unterlegenen Spezies zum Teil noch nicht möglich. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es einer 48-stündigen Anreicherung bedarf, wenn auch geringe Keimzahlen einer Spezies von *Campylobacter* neben einer Überzahl der anderen *Campylobacter* Spezies mit der Quadruplex real-time PCR erfasst werden sollen. Die in der Überzahl vorliegende Spezies würde jedoch bereits nach 24 Stunden Voranreicherung in jedem Fall ein positives Ergebnis für *Campylobacter* liefern. Bei Nachweismethoden, die die Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* gemeinsam erfassen, stellt sich dieses Problem nicht. So geben Josefsen *et al.* (2004) an, dass mit ihrer Nachweismethode der Nachweis von 1-10 KbE von *C. jejuni* in 25 ml Hähnchenspülwasser bereits nach 20 Stunden Voranreicherung möglich ist. Auch Oliveira *et al.* (2005) konnten mit ihrem *C. jejuni*-spezifischen real-time PCR-Nachweissystem 1 KbE in 25 g Lebensmittelprobe nach 24 Stunden Voranreicherung nachweisen.

Bei den Versuchen zur artifiziellen Kontamination von Lebensmitteln wurden Laborstämme

eingesetzt, die sich in der Regel in einem guten physiologischen Zustand befinden. Bakterien, die hingegen nativ im Lebensmittel vorkommen, sind oftmals geschwächt oder subletal geschädigt. Deshalb kann nicht davon ausgegangen werden, dass sie sich gleichermaßen wie die hier eingesetzten Stämme vermehren, sondern zunächst eine Regenerationszeit benötigen. Dennoch sollten auch wenige, noch lebensfähige Zellen innerhalb der 48-stündigen Voranreicherung eine Keimzahl erreichen, die über der Nachweisgrenze von etwa 10^3 KbE/ml der Quadruplex real-time PCR liegt.

Weitere wichtige Kriterien für eine diagnostische PCR sind ihre **Reproduzierbarkeit** und ihre **Robustheit** gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen (Malorny *et al.*, 2003). Eine hohe Robustheit einer Methode ermöglicht eine gute Reproduzierbarkeit in verschiedenen Laboren. Dies ist vor allem für die Standardisierung von PCR-Verfahren von Bedeutung. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte eine hohe Präzision der Quadruplex real-time PCR gezeigt werden. Bei der viermaligen Untersuchung von DNA-Verdünnungsreihen kam es nur zu geringen Abweichungen der Ct-Werte für die gleichen Proben. Zur Bestimmung der Robustheit der Quadruplex real-time PCR wurden die Parameter Reagenzienkonzentration im Mastermix und Annealing-Temperatur variiert. Dabei erwiesen sich die Nachweissysteme für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* gegenüber Veränderungen der Konzentrationen von $\pm 20\%$ sowie Temperaturschwankungen von $\pm 2^\circ\text{C}$ als sehr robust, da sich die Ct-Werte um nur 1-2 Zyklen erhöhten. Aufgrund dieser Eigenschaften ist der Einsatz der Methode auch in anderen Laboren, in denen einzelne Parameter variieren können, denkbar. Die tatsächliche Eignung könnte allerdings erst durch eine Validierung in einem Ringversuch mit mehreren teilnehmenden Laboren bestimmt werden (Malorny *et al.*, 2003).

Anhand von **Standardkurven** der Ct-Werte von Proben bekannter DNA-Konzentration können die Amplifikationseffizienz und der lineare Zusammenhang zwischen der DNA-Konzentration und dem Ct-Wert einer real-time PCR ermittelt werden. Eine niedrige Amplifikationseffizienz kann durch die Optimierung der PCR-Bedingungen sowie durch die Entfernung möglicher Inhibitoren verbessert werden (Josefsen *et al.*, 2004). Um quantitative Aussagen treffen zu können, muss die Amplifikationseffizienz einer real-time PCR bekannt und konstant sein. Zudem muss ein starker linearer Zusammenhang zwischen der jeweiligen DNA-Konzentration und dem entsprechenden Ct-Wert bestehen (Yang *et al.*, 2003). Für die Nachweissysteme der Quadruplex real-time PCR wurden bei der Untersuchung von DNA-Verdünnungsreihen Effizienzen von 97,3% für das *C. jejuni*-Nachweissystem, 89,1% für das *C. coli*-Nachweissystem und 90,1% für das *C. lari*-Nachweissystem berechnet. Der lineare Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration in der Probe und dem entsprechenden Ct-Wert war mit Regressionskoeffizienten (R^2) von 0,994 für das *C. jejuni*-, 0,999 für das *C. coli*- und 0,997 für das *C. lari*-Nachweissystem hoch. Um die Nachweissysteme allerdings zur

Quantifizierung der DNA-Gehalte in Proben unbekannter Konzentration einsetzen zu können, müsste überprüft werden, ob diese Daten bei wiederholten Untersuchungen konstant bleiben. Aufgrund des Multiplex-Ansatzes müsste zusätzlich überprüft werden, ob die gleichzeitige Amplifizierung von zwei oder allen drei *Campylobacter* Spezies die Effizienzen der einzelnen Nachweissysteme beeinträchtigt. Von Hong *et al.* (2007) wurden Daten zur gleichzeitigen Quantifizierung von *C. jejuni* und *C. coli* in rohem Hähnchenfleisch mittels einer Duplex real-time PCR veröffentlicht. Die Autoren ermittelten vergleichbare Ergebnisse bei gleichzeitiger und einzelner Amplifizierung beider Spezies. Allerdings wurden nur jeweils gleiche Konzentrationen der beiden Spezies getestet. Es bleibt jedoch die Frage offen, wie sich die Effizienzen der beiden Nachweissysteme verändern, wenn wenig DNA der einen Spezies und viel DNA der anderen Spezies amplifiziert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum **Vergleich von Duplex- und Multiplex-Ansatz** mit in die Validierung eingeschlossen. Dabei wurden die drei Nachweissysteme für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* jeweils nur in Kombination mit dem internen Amplifikationssystem im Vergleich zum Multiplex-Ansatz getestet. Da die Integration einer internen Amplifikationskontrolle für die Standardisierung von PCR-Verfahren vorgeschrieben ist (Hoorfar *et al.*, 2003; Anonymus, 2005a), wurde der Duplex-Ansatz als Referenz im Vergleich zum Multiplex-Ansatz angesehen. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, weil bei Multiplex PCR-Verfahren generell die Gefahr besteht, dass es zu einem Sensitivitätsverlust der einzelnen Nachweissysteme kommt. Gründe hierfür können zum einen die Konkurrenz um Nukleotide und die DNA-Polymerase und zum anderen unterschiedliche optimale PCR Bedingungen der verschiedenen Assays sein (Hoorfar *et al.*, 2004; Iijima *et al.*, 2004). Es ist vorstellbar, dass bei gleichzeitigem Vorliegen aller Targetsequenzen in einer Probe diejenige mit den besten Bedingungen bezüglich der Anlagerung der Primer bzw. mit der höchsten Konzentration im Reaktionsansatz amplifiziert wird. Bei den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Proben, die nur DNA einer der drei *Campylobacter* Spezies enthielten nahezu gleiche Ergebnisse mit dem Duplex- und dem Quadruplex-Ansatz lieferten. Bei Proben mit Keimgemischen fiel jedoch auf, dass die DNA der Spezies, die im Vergleich zur DNA der beiden anderen Spezies nur in geringer Konzentration in der Probe vorlag, mit dem Quadruplex-Ansatz nicht amplifiziert wurde, während beim Duplex-Ansatz ein positives Signal detektiert werden konnte. In einem weiteren Versuch, in dem die drei Targetsequenzen in jeweils gleicher DNA-Konzentration eingesetzt wurden, konnten auch niedrige Konzentrationen gleichzeitig amplifiziert werden. Daran wird deutlich, dass der Multiplex-Ansatz nur bei einem starken Ungleichgewicht der DNA-Konzentrationen der verschiedenen Targetsequenzen zu Sensitivitätsverlusten führt, aufgrund derer das Vorhandensein einer *Campylobacter* Spezies neben den beiden anderen nicht angezeigt wird. Diese Art von Sensitivitätsverlust stellt jedoch keine Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar, da schon die

Detektion einer Spezies von *Campylobacter* in einer Probe zur Beanstandung führt. Die Vorteile des Multiplex-Ansatzes, die aufgrund der gleichzeitigen Detektion verschiedener Zielorganismen vor allem in einem geringeren Arbeits- und Zeitaufwand sowie in niedrigeren Kosten durch Einsparung von Reagenzien für den Mastermix zu sehen sind, dürften damit gegenüber dem Nachteil eines leichten Sensitivitätsverlustes überwiegen.

Die Untersuchung von nativ kontaminierten Proben mit der Quadruplex real-time PCR parallel zur geltenden Referenzmethode (kulturelles Nachweisverfahren) als wichtiger Bestandteil bei der Validierung einer Alternativmethode wird unter dem nachfolgenden Punkt eigens diskutiert.

3. Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit der konventionellen Diagnostik

Bei der Validierung einer Alternativmethode im Vergleich zur aktuellen Referenzmethode soll eine repräsentative Anzahl nativ kontaminierter Lebensmittelproben über einen längeren Zeitraum parallel mit beiden Methoden untersucht werden (Hübner *et al.*, 2002). Nach ISO 16140:2003 sind fünf verschiedene Lebensmittelkategorien abzudecken, wenn das Verfahren auf alle Lebensmittel angewendet werden soll. Andernfalls beschränkt sich die Anzahl auf diejenigen Kategorien, die damit analysiert werden sollen. Aus jeder Kategorie sind 60 Proben zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 464 Lebensmittelproben aus den Kategorien Geflügel, Fisch und Meeresfrüchte, Fleischprodukte sowie Obst- und Gemüseprodukte untersucht. Die insgesamt 331 Geflügelproben stellten den Großteil der Proben dar, weil diese Lebensmittelkategorie hinsichtlich einer Kontamination mit *Campylobacter* spp. die größte Bedeutung hat. Bei Fisch- und Meeresfrüchten und bei Fleischprodukten betrug die Anzahl der untersuchten Proben 61 und 62. Es wurden nur zehn Salatproben analysiert, weil rohes Obst und Gemüse kaum in Zusammenhang mit *Campylobacter*-Infektionen gebracht werden. Für die Untersuchung der Proben mit der Quadruplex real-time PCR wurden aus denselben Voranreicherungen, die auch für die konventionelle Diagnostik verwendet wurden, Aliquots entnommen und analysiert.

Hinsichtlich eines positiven oder negativen Ergebnisses für den Nachweis von *Campylobacter* spp. betrug der Konkordanzindex κ als Maß für die statistische Übereinstimmung zweier Prüfverfahren 0,7. Laut Hübner *et al.* (2002) wird die Übereinstimmung als genügend bezeichnet, wenn κ größer gleich 0,81 ist. Die damit ungenügende Übereinstimmung der Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR mit dem Referenzverfahren beruht letztendlich jedoch nur darauf, dass mit dem molekularbiologischen Verfahren mehr

positive Proben als mit dem kulturellen Verfahren detektiert wurden. Während die Quadruplex real-time PCR bei insgesamt 55,4% der untersuchten Proben ein positives Signal lieferte, wurden mit der konventionellen Diagnostik nur bei 40,3% der Proben *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Dieses Ergebnis spricht für eine höhere Sensitivität der real-time PCR im Vergleich zum kulturellen Verfahren, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Gentry-Weeks *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2004). Oftmals werden die höheren Nachweisraten bei der Anwendung von PCR-Verfahren auch mit der Detektion von DNA toter oder geschädigter Zellen begründet (Iijima *et al.*, 2004; Mäde *et al.*, 2004). Andererseits zeigten Uyttendaele *et al.* (1999), dass Waschschriffe vor der DNA-Extraktion effektiv zur Entfernung von DNA toter oder geschädigter Zellen beitragen. Zudem ist insbesondere bei Fleischproben auch ein Abbau von bereits freier DNA durch Nukleasen bzw. eine Bindung an die Lebensmittelmatrix zu beobachten (Uyttendaele *et al.*, 1999; Wolffs *et al.*, 2005). Diese Argumente sprechen eher gegen die Annahme, dass falsch-positive Signale bei der real-time PCR durch die Amplifizierung von DNA toter oder geschädigter Zellen hervorgerufen werden. Eine Überprüfung, ob in einer Probe DNA toter Zellen nachgewiesen wurde, kann erfolgen, indem man auch vor der bakteriellen Voranreicherung ein Aliquot der Probe mit der real-time PCR untersucht. Bei Anwesenheit lebender Zellen kommt es zu einer Verringerung des Ct-Wertes nach der Voranreicherung. Bei toten Zellen hingegen bleibt der Ct-Wert während der Voranreicherung konstant bzw. er erhöht sich, da keine Vermehrung der Zellen statt findet bzw. DNA toter Zellen abgebaut wird. In dieser Arbeit wurde ein Teil der Proben auch bereits nach 24 Stunden Voranreicherung untersucht. Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchung im Vergleich zu den Ergebnissen nach 48 Stunden Voranreicherung kann ebenfalls beurteilt werden, ob in den Proben DNA lebender oder toter Keime nachgewiesen wurde. Von insgesamt 147 Proben konnten mit dem kulturellen Verfahren bei 51 Proben *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden. Die real-time PCR lieferte nach 48 Stunden Voranreicherung bei 78 Proben ein positives Ergebnis, während nach 24 Stunden Voranreicherung erst 66 Proben *Campylobacter*-positiv waren. Die Ergebnisse zeigen, dass bei 15 Proben nach 24 Stunden Voranreicherung noch kein Nachweis möglich war, während nach 48 Stunden Voranreicherung ein positives Signal detektiert werden konnte. Somit muss es sich um lebende Zellen gehandelt haben, die sich zwischen 24 und 48 Stunden Voranreicherung auf eine detektierbare Keimzahl vermehrt haben. Auch die Tatsache, dass diese Proben größtenteils hohe Ct-Werte von über 34 hatten, spricht für eine sehr schwache, aber dennoch vorhandene Kontamination der Proben und somit für eine hohe Sensitivität der Quadruplex real-time PCR. Allerdings trat bei drei Proben auch der umgekehrte Fall auf. Sie waren nach 24 Stunden Voranreicherung schwach positiv, nach 48 Stunden hingegen negativ. Bei diesen Proben könnte es sich um den Nachweis von DNA toter Zellen gehandelt haben, die nach längerer Anreicherung bereits

abgebaut war. Die restlichen Proben (n=13), bei denen kulturell kein Nachweis möglich war, die real-time PCR jedoch nach 24 und nach 48 Stunden Voranreicherung ein positives Ergebnis lieferte, wiesen Ct-Werte auf, die im Durchschnitt nach 48 Stunden um 1,6 Zyklen (Standardabweichung = 3,19) niedriger waren als nach 24 Stunden Voranreicherung. Dies spricht ebenfalls für den Nachweis lebender Zellen beim Großteil dieser Proben. Neben der Annahme, dass real-time PCR-Verfahren falsch positive Ergebnisse aufgrund der Amplifizierung von DNA aus toten Zellen liefern, sollte vielmehr aber auch bedacht werden, dass es dem kulturellen Verfahren zum Teil an Sensitivität mangelt. Beispielsweise haben eigene Erfahrungen gezeigt, dass bei schwach real-time PCR-positiven Proben oftmals durch eine zweite Anreicherung die Isolierung von *Campylobacter* spp. möglich ist. Auch Mäde *et al.* (2004) berichten dies beim Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln. Der kulturelle Nachweis ist auch bei Zellen, die im so genannten „viable but non culturable“ Zustand vorliegen, nicht möglich (McKillip und Drake, 2004). Auch wenn es Untersuchungen gibt, die dieser Zustandsform von *Campylobacter* spp. eine eher unbedeutende Rolle im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Darmkolonisierung und Infektiosität zumessen (Beumer *et al.*, 1992; Medema *et al.*, 1992; Van de Giessen *et al.*, 1996; Ziprin *et al.*, 2003; Ziprin und Harvey, 2004), ist man sich ihrer Bedeutung letztendlich immer noch unklar (Park, 2002; Murphy *et al.*, 2006).

Es soll noch einmal betont werden, dass mit der Quadruplex real-time PCR als Alternativmethode im Vergleich zur kulturellen Referenzmethode alle kulturell positiven Proben detektiert werden konnten. Damit ist die Methode mindestens genauso zuverlässig in der Detektion von *Campylobacter*-positiven Lebensmitteln, die ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher darstellen. Auch beim Einsatz der Quadruplex real-time PCR nach nur 24 Stunden Voranreicherung konnten 98,0% der kulturell positiven Proben erfasst werden. Damit könnte mit der Methode ein weiterer Tag Zeitersparnis erzielt werden. Vergleicht man aber die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR nach 24 und nach 48 Stunden Voranreicherung, so wurden nach 24 Stunden nur 80,8% der nach 48 Stunden positiven Proben detektiert. Um mit der Quadruplex real-time PCR eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, empfiehlt sich daher eine Voranreicherung von 48 Stunden.

Vergleicht man die beiden Methoden hinsichtlich der Ergebnisse für die Identifizierung der einzelnen *Campylobacter* Spezies, so ergaben sich zwei wesentliche Unterschiede. Zum einen wurden mit der Quadruplex real-time PCR bei einem beträchtlichen Anteil der positiven Geflügelproben (32,6%) Mischinfektionen mit zwei verschiedenen Spezies von *Campylobacter* detektiert, während mit dem kulturellen Verfahren in der Regel nur eine bakterielle Kolonie biochemisch differenziert wurde. Die Tatsache, dass oftmals verschiedene Spezies in einer Probe vorliegen, ist vor allem in Hinblick auf epidemiologische Fragestellungen und die Aufklärung von Infektionsketten bedeutsam. Während es für die konventionelle Dia-

agnostik einen großen Aufwand darstellt, verschiedene Spezies zunächst aus einer Probe zu isolieren und anschließend mehrere Kolonien auf einer Agarplatte zu differenzieren, ist dies bei der Quadruplex real-time PCR mit einem einzigen Ansatz möglich. Zum anderen lieferte das zur biochemischen Identifizierung eingesetzte api[®] Campy-Testkit (BioMérieux) bei der Identifizierung von Isolaten von *C. lari* oftmals keine eindeutigen Ergebnisse. Die Quadruplex real-time PCR detektierte *C. lari*-positive Proben jedoch zuverlässig. Schließlich erhält man bei der Quadruplex real-time PCR gleichzeitig mit dem Nachweis auch das Identifizierungsergebnis. Die biochemische Differenzierung hingegen nimmt nach der Isolierung des Keimes weitere zwei Tage bis zum Erhalt des Ergebnisses in Anspruch.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Quadruplex real-time PCR bei geringem Arbeitsaufwand innerhalb weniger Stunden nach der kulturellen Voranreicherung zuverlässige und umfassende Ergebnisse liefert, während die konventionelle Diagnostik im positiven Fall bis zu acht Tage für ein endgültiges Identifikationsergebnis beansprucht. Da bei Lebensmitteln aber bisher noch das bakterielle Isolat vorliegen muss, um eine rechtskräftige Beanstandung vornehmen zu können, kann das PCR-Verfahren in der Routineanalytik vorerst nur als schnelles Screening-Verfahren eingesetzt werden. Die Quadruplex real-time PCR kann außerdem zur Differenzierung von Isolaten von *Campylobacter* spp. anstelle biochemischer Tests Anwendung finden. In dieser Arbeit konnte bei der parallelen Untersuchung von 201 Isolaten mit der biochemischen und der molekularbiologischen Methode gezeigt werden, dass die Quadruplex real-time PCR die zuverlässigere der beiden Methode ist. Zum einen wurde bei allen Proben ein eindeutiges Ergebnis erzielt, während mit dem api[®] Campy-Testkit bei 6% der Proben keine eindeutige Identifizierung aufgrund von uneindeutigen oder widersprüchlichen biochemischen Reaktionen möglich war. Zum anderen wurden bei insgesamt 12% diskrepanter Ergebnisse der beiden Methoden durch Sequenzierung jeweils die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR bestätigt. Neben der größeren Zuverlässigkeit bringt die Quadruplex real-time PCR einen Zeitvorteil von zwei Tagen gegenüber dem api[®] Campy-Testkit mit sich. Ein weiterer Vorteil ist in den Kosten zu sehen. Für eine real-time PCR-Reaktion sind für die Reagenzien ca. 1,20 € zu rechnen. Die Kosten für das Verbrauchsmaterial betragen ca. 0,10 € pro Reaktion. Ein api[®] Campy Test kostet hingegen ca. 5,50 €. Damit ist bei Vorhandensein eines real-time PCR-Gerätes die molekularbiologische Identifizierung die kostengünstigere Alternative.

4. Vergleich der Quadruplex real-time PCR mit anderen real-time PCR-Methoden zum Nachweis von *Campylobacter* spp.

Die Leistungsfähigkeit der in dieser Arbeit entwickelten Multiplex real-time PCR wurde auch im Vergleich zu anderen real-time PCR-Verfahren zum Nachweis der thermophilen *Campylobacter* Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* überprüft. Hierfür wurden zwei Methoden ausgewählt, die aufgrund ihrer Eigenschaften einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von *Campylobacter* spp. versprechen.

Das Nachweissystem nach Josefsen *et al.* (2004), das auf dem **16S rRNA-Gen** basiert und gleichzeitig *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* nachweist, zeichnet sich dadurch aus, dass es bereits in einem europäischen Ringversuch von zwölf Laboratorien aus elf europäischen Ländern getestet worden ist (Josefsen *et al.*, 2004a). Das Ergebnis des Ringversuches war eine Sensitivität von 96,7% bei den Geflügelproben und von 94,2% bei den Schweineproben. Die Spezifität lag bei 100% für die Geflügelproben und bei 83,3% bei den Schweineproben. Auch Lick *et al.* (2007) stellten bei ihren Untersuchungen eine ausgezeichnete Inklusivität und Exklusivität dieses Nachweissystems fest und empfehlen dessen Einsatz als Screening-Methode. Die Methode ist zudem als sehr robust einzustufen, da bei der Optimierung der PCR-Bedingungen für diese Arbeit gezeigt werden konnte, dass das *Campylobacter*-Nachweissystem ohne Sensitivitätsverlust mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Mastermixen angewandt werden kann (Breitenwieser, 2007).

Die parallele Untersuchung von 206 Lebensmittelproben nach 48-stündiger Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR und der 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) zeigte eine sehr gute Übereinstimmung von 96,6% der Ergebnisse auf. Diskrepanzen zwischen den beiden Methoden traten nur bei schwach positiven Proben auf, die entweder nur mit der einen oder nur mit der anderen Methode detektiert wurden. Auch bei der Untersuchung von 56 Proben nach nur 24-stündiger Voranreicherung ergaben die beiden Methoden zu 98,2% ein übereinstimmendes Ergebnis. Damit wurden die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR durch die 16S rDNA real-time PCR nach Josefsen *et al.* (2004) bestätigt und die beiden Methoden sind als gleichermaßen sensitiv einzustufen. Mit dem Nachweissystem nach Josefsen *et al.* (2004) kann im Gegensatz zur Quadruplex real-time PCR allerdings nicht zwischen den drei verschiedenen *Campylobacter* Spezies unterschieden werden. Andererseits ist der Zeitaufwand zum Pipettieren des Mastermixes durch den Einsatz von nur zwei Primerpaaren und zwei Sonden bei der 16S rDNA real-time PCR und dadurch auch der Kostenaufwand im Vergleich zu fünf Primerpaaren und vier Sonden bei der Quadruplex real-time PCR geringer. Somit sollte je nach Zielsetzung entschieden werden, welche real-time PCR-Methode Anwendung findet. Für ein reines Screening von Lebensmitteln auf die Anwesenheit thermophiler *Campylobacter* spp. empfiehlt sich die

weniger aufwändige und günstigere Methode nach Josefsen *et al.* (2004). Soll jedoch auch die *Campylobacter* Spezies in einer Lebensmittelprobe bestimmt werden, liefert die Quadruplex real-time PCR ein schnelles und zuverlässiges Ergebnis. Die Quadruplex real-time PCR kann zudem auch zur Identifizierung von Isolaten von *Campylobacter* spp. eingesetzt werden, was mit der 16S rDNA real-time PCR nicht möglich ist.

Als weitere real-time PCR-Methode wurde das **BAX[®] System** (DuPont Qualicon) im Vergleich zur Quadruplex real-time PCR getestet. Dieses Nachweissystem wurde ausgewählt, weil es ebenfalls die Differenzierung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* verspricht und sich durch eine einfache Handhabung aufgrund der integrierten Lyse und des Mastermixes in dehydrierter Form auszeichnet. Die Ergebnisse der Untersuchung von 78 Lebensmittelproben nach 48 Stunden Voranreicherung zeigten eine Übereinstimmung von 93,6% der beiden Methoden hinsichtlich eines positiven oder negativen Nachweises auf. Insgesamt war das BAX[®] System etwas unsensitiver als die Quadruplex real-time PCR, da fünf schwach positive Proben nicht detektiert wurden und bei drei Proben im Gegensatz zur Quadruplex real-time PCR keine Mischinfektion angezeigt wurde. Dennoch wurden alle Lebensmittelproben, welche mittels konventioneller Diagnostik als *Campylobacter*-positiv detektiert wurden, auch mit dem BAX[®] System erfasst. Bei der Untersuchung von Isolaten von *Campylobacter* spp. aus Lebensmitteln lieferte das BAX[®] System bei 97,7% der Proben aus Geflügel ein mit der Quadruplex real-time PCR übereinstimmendes Ergebnis. Bei den Isolaten aus Muscheln wies es allerdings große Unzulänglichkeiten auf, da bei 24 der 26 mittels biochemischen Tests oder durch Sequenzierung bestätigten Isolate von *C. lari* im Gegensatz zur Quadruplex real-time PCR kein positives Signal detektiert wurde.

Das BAX[®] System stellt somit für den Nachweis von *C. jejuni* und *C. coli* bei etwas niedrigerer Sensitivität eine gute Alternative zur Quadruplex real-time PCR dar. Eine Überarbeitung des Nachweises von *C. lari* durch den Hersteller ist jedoch unabdingbar.

Insgesamt ist allen drei real-time PCR-Verfahren gemeinsam, dass sie gegenüber der konventionellen Diagnostik weniger zeitaufwändig sind. Bereits nach 48-stündiger Voranreicherung liegt innerhalb weniger Stunden ein positives bzw. negatives Ergebnis für den *Campylobacter*-Nachweis vor. Auch die bereits mehrfach beschriebene höhere Sensitivität von real-time PCR-Verfahren im Vergleich zur Kultur (Gentry-Weeks *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2004) wurde durch die hier getesteten Verfahren bestätigt. Damit eignen sich alle drei Methoden als Screening-Verfahren in der Lebensmitteldiagnostik.

5. Kontamination von Lebensmitteln mit *Campylobacter* spp.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insbesondere bei Geflügel hohe Kontaminationsraten mit *Campylobacter* spp. ermittelt, die für die hohe Anzahl von *Campylobacter*-Infektionen beim Menschen verantwortlich sein könnten.

Bei den Hähnchenproben lagen die Positivraten von 73,0% mit der kulturellen Methode bzw. 82,8% mit der Quadruplex real-time PCR über dem von Humphrey *et al.* (2007) berechneten Wert von ca. 60% für rohes Hähnchenfleisch. Da es sich dabei aber um einen Durchschnittswert aus Zahlen verschiedener Länder handelt, sind Abweichungen einzelner Länder durchaus möglich. Die für Deutschland ermittelten Zahlen von 33% bzw. 46% (Kist, 2002) wurden bei weitem übertroffen. Diese Angaben stammen jedoch aus Untersuchungen aus früheren Jahren (1996 und 1999). Neuere Zahlen zur Kontamination von Hähnchenfleisch in Deutschland stammen von Klein *et al.* (2007), die bei der Untersuchung von 30 Hähnchenfleischproben direkt nach der Schlachtung mittels kulturellem Verfahren 30% *Campylobacter*-positive Proben ermittelten. Adam *et al.* (2006) identifizierten sowohl mit dem kulturellen als auch mit einem PCR-Verfahren 32% positive Proben bei der Untersuchung von 356 rohen Hähnchenfleischproben in Baden-Württemberg. Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim betrug die Positivrate der untersuchten Hähnchenfleischproben hingegen im Jahr 2003 43,4% (n=145), 2004 70,8% (n=185), 2005 67,9% (n=218) und 2006 58,2% (n=184) (Daten unveröffentlicht). Die bayerischen Daten sprechen für eine Erhöhung der Prävalenz von *Campylobacter* spp. in Hähnchenfleisch im Laufe der letzten Jahre. Der Grund für die hohe Zahl positiver Proben in Bayern könnte allerdings auch in der Optimierung der kulturellen Nachweismethode zu sehen sein. Die Filtration der Anreicherungsbouillon vor dem Ausstreichen auf dem Nährboden führte nachweislich zur Erhöhung der Isolationsrate (Elmer-Englhard *et al.*, 1998). Mit dem kulturellen Verfahren wurden bei Entenfleisch Nachweisraten von 55,6% und bei Putenfleisch 29,8% positive Proben ermittelt. Die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR waren jeweils noch höher (72,6% bei Ente und 53,3% bei Pute). Damit lag der Anteil positiver Befunde bei den Entenproben über dem durchschnittlichen Wert von 30,2% (Humphrey *et al.*, 2007). Die Prävalenz bei den Putenproben war mit dem kulturellen Verfahren hingegen niedriger als der von Humphrey *et al.* (2007) berechnete Wert von 47,8%. Sie stimmte jedoch gut mit der von Atanassova *et al.* (2007) bestimmten Prävalenz von 34% bei der Untersuchung von 100 Truthahnfleischproben aus dem Einzelhandel überein. Zur Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Gänsefleisch gibt es keine veröffentlichten Daten. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass vor allem *C. jejuni* häufig im Intestinaltrakt von Gänsen vorkommt (Aydin *et al.*, 2001). Dies bestätigt die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, bei denen bei allen positiven Proben (10,3%) *C. jejuni*

identifiziert wurde.

Als dominierende Spezies bei Geflügel wird *C. jejuni* angesehen (Aarestrup *et al.*, 1997; Kist, 2006). In dieser Arbeit wurde mit dem kulturellen Verfahren bei 70,8% der positiven Hähnchenproben *C. jejuni* und bei 28,1% *C. coli* identifiziert. Die Quadruplex real-time PCR detektierte dagegen bei denselben Proben bei 66,3% *C. jejuni*, bei 4,0% *C. coli* und bei 29,7% eine Mischinfektion mit *C. jejuni* und *C. coli*. Damit konnte bei fast allen Proben (96%) *C. jejuni* nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Pezzotti *et al.* (2003) wurde hingegen mittels kulturellem Nachweisverfahren und biochemischer Differenzierung bei nur 56,2% von 155 untersuchten Hähnchenfleischproben *C. jejuni* und bei 43,8% *C. coli* bestimmt. Mischinfektionen mit beiden Spezies wiesen die Autoren nur bei 8,2% der von ihnen untersuchten Kotproben von 158 verschiedenen Broilerherden nach. Die Erklärung für diese Ergebnisse könnte darin liegen, dass auch in der Studie von Pezzotti *et al.* (2003) durch die Anwendung des kulturellen Verfahrens Mischinfektionen nicht identifiziert wurden, weil die in geringerer Anzahl vorhandene Spezies in den meisten Proben kulturell nicht erfasst wurde. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Hähnchenproben konnte gezeigt werden, dass bei den meisten Proben, bei denen eine Mischinfektion vorlag, *C. jejuni* einen höheren Ct-Wert als *C. coli* in der Quadruplex real-time PCR lieferte und kulturell nur *C. coli* isoliert wurde. Damit wurde die Anwesenheit von *C. jejuni* in einem Teil der Proben mit dem kulturellen Verfahren nicht erkannt. Bei den untersuchten Entenproben wurde sowohl mit dem kulturellen Verfahren als auch mit der real-time PCR ebenfalls am häufigsten *C. jejuni* mit 58,7% bzw. 44,9% nachgewiesen. Bei der real-time PCR war der hohe Anteil (39,8%) von Mischinfektionen mit *C. jejuni* und *C. coli* auffällig. Interessanterweise konnte bei den Entenproben mit beiden Verfahren bei jeweils 4% der positiven Proben *C. lari* detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe Vielfalt von *Campylobacter* Spezies bei Enten hin. Sie bestätigen die Untersuchungen von Ridsdale *et al.* (1998), die bei Entenkarkassen ebenfalls *C. jejuni* und *C. coli* sowie *Arcobacter* spp. isolierten. Während die Autoren *C. lari* nicht nachwiesen, konnten sie aus Zäkumproben *C. upsaliensis* isolieren. Nayak *et al.* (2005) untersuchten 74 Isolate aus Truthahn mit einer real-time PCR zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli*. Dabei identifizierten sie bei 41% der Proben *C. jejuni* und bei 59% *C. coli*. In dieser Arbeit wurden 13 Isolate aus Puten- bzw. Truthahnfleisch mit beiden Verfahren zu 46% als *C. jejuni* und zu 54% als *C. coli* bestimmt. Somit stimmen die Ergebnisse der beiden Untersuchungen gut überein und bestätigten die Dominanz von *C. coli* bei Puten (Kist, 2006). Bei der Untersuchung der Anreicherungen der Lebensmittelproben wurde mit der Quadruplex real-time PCR allerdings häufiger *C. jejuni* mit 58,3% im Gegensatz zu *C. coli* mit 29,2% detektiert. Mischinfektionen mit beiden Spezies waren bei Putenfleisch mit 12,5% vergleichsweise niedrig. Auffällig war jedoch, dass aus dem Großteil der *C. jejuni*-positiven Proben (64,3%) kein kultureller Nachweis aufgrund von sehr

schwachen Kontaminationen möglich war. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Prävalenz von *C. jejuni* bei Putenfleisch bei der Anwendung von kulturellen Nachweisverfahren unterschätzt wird.

Bei der Untersuchung der Muschelproben wurde mit der kulturellen Methode bei 21,9% der Proben *Campylobacter* spp. nachgewiesen. Dieser Wert war im Vergleich zur Untersuchung von Endtz *et al.* (1997), die bei 69% der von ihnen untersuchten Muschelchargen *Campylobacter* spp. detektierten, sehr niedrig. Mit der Quadruplex real-time PCR lieferten allerdings 50,0% der Proben ein positives Signal. Eine Erklärung für die hohe Diskrepanz könnte darin liegen, dass die in den Proben anwesenden Keime aufgrund des Transportes und der Lagerung bis zur Untersuchung nicht mehr kultiviert werden konnten und somit nur noch mit der Quadruplex real-time PCR detektierbar waren. Die von Endtz *et al.* (1997) untersuchten Proben wurden hingegen nur maximal 24 Stunden bis zur Untersuchung gelagert, was die Wahrscheinlichkeit erhöhte, dass ein kultureller Nachweis noch möglich war. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Muschelproben wurde bei 81,3% der mittels Quadruplex real-time PCR positiven Proben *C. lari* detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich weitestgehend mit dem von Endtz *et al.* (1997), die sogar bei 95% der positiven Proben *C. lari* identifizierten.

Bei Fisch, Schweine- und Rindfleisch wurden in dieser Arbeit nur mit der Quadruplex real-time PCR niedrige Positivraten detektiert, während der kulturelle Nachweis für diese Produktgruppen negativ war. Diese Ergebnisse stimmen mit Angaben in der Literatur überein, die bei diesen Lebensmitteln ebenfalls keine oder niedrige Kontaminationsraten detektierten (Pezotti *et al.*, 2003; Pless *et al.*, 2004; Ha und Pham, 2006; Humphrey *et al.*, 2007).

Alle zehn in dieser Arbeit untersuchten Salatproben waren sowohl mit dem kulturellen als auch mit dem molekularbiologischen Verfahren *Campylobacter*-negativ. Diese Ergebnisse bestätigen andere Studien (Park and Sanders, 1992; Kumar *et al.*, 2001), die ebenfalls nur niedrige Prävalenzen oder keine Kontaminationen bei rohem Gemüse vorfanden. Chai *et al.* (2007) ermittelten hingegen Kontaminationsraten von über 50% bei rohem Gemüse in malaysischen Supermärkten. Die Autoren führen diese Ergebnisse auf mangelnde Hygiene und daraus folgender Kreuzkontamination durch andere Produkte wie beispielsweise rohem Geflügel in den Lager- und Verpackungsräumen in Supermärkten zurück. Aufgrund der hohen Hygienestandards in Deutschland dürfte die Kontamination von Obst- und Gemüseprodukten mit *Campylobacter* spp. gering sein.

Die Kontaminationsraten von Lebensmitteln mit *Campylobacter* spp. können auch von ihrem Behandlungsstatus abhängen. Beispielsweise konnte in einer Studie in Island ein Zusammenhang zwischen dem Verkauf von gefrorenen Hähnchen und dem Rückgang positiver Proben sowie menschlicher Infektionen aufgezeigt werden (Stern *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten Proben waren zum Teil frisch und zum Teil gefroren. Innerhalb

einer Geflügelart konnte bei den Entenproben eine Unterscheidung zwischen frischen und gefrorenen Proben vorgenommen werden. Bei den frischen Proben (n = 33) waren 81,8% mit dem kulturellen Verfahren und 97,0% mit der Quadruplex real-time PCR positiv, während bei den gefrorenen Proben (n = 102) nur 47,1% bzw. 65,7% positiv waren. Bei den anderen Geflügelarten konnte dieses Merkmal nicht überprüft werden, da die Hähnchen- und Putenproben größtenteils frisch, die Gänseproben hingegen hauptsächlich gefroren waren. Das Ergebnis der Entenproben deutet darauf hin, dass sowohl mit dem kulturellen als auch mit dem molekularbiologischen Verfahren bei frischen Produkten häufiger *Campylobacter* spp. nachgewiesen werden können als bei gefrorenen. Wenngleich ein Überleben der Keime trotz Einfrieren möglich ist, scheint diese Maßnahme dennoch effektiv zur Reduzierung *Campylobacter*-positiver Produkte beizutragen.

Es konnte insbesondere mit der Quadruplex real-time PCR aufgezeigt werden, dass die Kontaminationsraten von Lebensmitteln mit *Campylobacter* spp. höher sind, als bislang angenommen wurde. Durch die Anwendung dieser sensitiven Methode, die simultan verschiedene Spezies von *Campylobacter* in einer Lebensmittelprobe detektiert, können bessere Einblicke in den Kontaminationsstatus gewonnen und damit auch Infektionsrisiken für den Verbraucher besser eingeschätzt werden. Die erhaltenen Daten können dazu dienen, Verbraucher auf Risiken hinzuweisen und Verhaltensregeln zu empfehlen.

F. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Quadruplex real-time PCR-Verfahren zum parallelen Nachweis und zur Differenzierung der lebensmittelrelevanten thermophilen *Campylobacter* spp. *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* in verschiedenen Lebensmitteln, vor allem in Geflügel, Fleisch, Fisch und Muscheln etabliert und anhand von Feldproben parallel zur konventionellen Diagnostik validiert.

Die Basis für das Nachweissystem bildete ein veröffentlichtes real-time PCR-Verfahren für *C. jejuni* und *C. coli*. Durch Sequenzierung von zwölf Stämmen der Spezies *C. lari* auf dem Gen für die Gyrase Untereinheit A wurde ein spezifisches Nachweissystem für *C. lari* entwickelt. Die drei *Campylobacter*-spezifischen Nachweissysteme wurden mit einem internen Amplifikationskontrollsystem zu einer Quadruplex real-time PCR kombiniert, um auch falsch negative PCR-Ergebnisse aufgrund von Inhibition anzuzeigen. Durch die Markierung der vier TaqMan[®]-Sonden mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist die parallele Detektion der einzelnen Nachweissysteme in einem entsprechenden real-time PCR-Gerät möglich.

Die Überprüfung der Methode auf ihre Selektivität ergab für alle drei *Campylobacter*-spezifischen Nachweissysteme eine Inklusivität von 100%. Das *C. jejuni*-Nachweissystem wies aufgrund weniger schwach positiver Signale von „Non-Target“ Stämmen eine Exklusivität von 94,7% auf. Für das *C. coli*- und das *C. lari*-Nachweissystem betrug auch die Exklusivität 100%.

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze der Quadruplex real-time PCR anhand von Verdünnungsreihen von Reinkulturen wurde eine Detektionswahrscheinlichkeit von 100% bei mindestens $1,1 \times 10^3$ KbE/ml von *C. jejuni*, $8,9 \times 10^3$ KbE/ml von *C. coli* und $4,5 \times 10^2$ KbE/ml von *C. lari* ermittelt.

Das Nachweissystem weist eine hohe Präzision auf, da bei wiederholten Untersuchungen derselben DNA-Verdünnungsreihen nur geringe Variationen der Ct-Werte auftraten. Es ist auch hinsichtlich Schwankungen der Konzentration des Mastermixes von $\pm 20\%$ sowie der Annealingtemperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$ als sehr robust einzustufen. Bei Versuchen mit veränderten Parametern veränderten sich die Ct-Werte maximal um 1-2 Zyklen.

Für die Untersuchung von Lebensmitteln mit der Quadruplex real-time PCR wurden die Proben analog dem kulturellen Verfahren 48 Stunden unter mikroaeroben Bedingungen selektiv vorangereichert. Aus einem Milliliter der Voranreicherung wurde DNA mit einer einfachen Kochmethode extrahiert und 5 μl des Extraktes in die PCR eingesetzt.

Bei der Untersuchung von artifiziell kontaminierten Lebensmittelproben (jeweils drei Versuche pro Spezies mit drei verschiedenen Keimkonzentrationen) war der Nachweis von 1-10 KbE von *C. jejuni*, *C. coli* oder *C. lari* in 25 g Lebensmittel vor einer charakteristischen Hintergrundflora und bei Anwesenheit der jeweils beiden anderen *Campylobacter* Spezies möglich.

Mit der etablierten Methode wurden insgesamt 464 natürlich kontaminierte Lebensmittelproben parallel zur konventionellen Diagnostik bestehend aus kulturellem Nachweis und biochemischer Speziesdifferenzierung untersucht. Die Ergebnisse der beiden Methoden bezüglich des Nachweises von *Campylobacter* spp. stimmten zu 84,9% überein. Die Diskrepanz ergab sich allein dadurch, dass mit der Quadruplex real-time PCR insgesamt mehr positive Proben (55,4%) als mit dem konventionellen Verfahren (40,3%) detektiert wurden. Hinsichtlich der Speziesidentifizierung unterschieden sich die beiden Methoden darin, dass mit der Quadruplex real-time PCR bei einem hohen Anteil positiver Geflügelproben (32,6%) Mischinfektionen mit zwei verschiedenen Spezies von *Campylobacter* detektiert wurden, während mit der konventionellen Diagnostik in der Regel nur eine Spezies identifiziert wurde. Bei der Untersuchung eines Teils der Proben (n=147) bereits nach 24 Stunden Voranreicherung mit der Quadruplex real-time PCR konnten 98,0% der kulturell positiven Proben und 80,8% der nach 48 Stunden Voranreicherung PCR-positiven Proben detektiert werden.

Die Quadruplex real-time PCR wurde auch zur Differenzierung von bakteriellen Isolaten von *Campylobacter* spp. eingesetzt. Verglichen mit dem Ergebnis der konventionellen Diagnostik (api® Campy-Testkit) betrug die Übereinstimmung bei insgesamt 201 untersuchten Isolaten 88,1%. Bei 11,9% wurde mit der biochemischen Methode kein eindeutiges oder ein falsches Ergebnis ermittelt. Bei Proben mit diskrepanten Ergebnissen wurden die Ergebnisse der Quadruplex real-time PCR durch Sequenzierung verifiziert.

Es wurde ein Vergleich der etablierten Methode mit zwei anderen real-time PCR-Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter* spp. durch die parallele Untersuchung von Lebensmittelproben und Isolaten durchgeführt. Dabei ergab sich eine gute Übereinstimmung von 96,6% (n=206, 48h Voranreicherung) bzw. 98,2% (n=56, 24h Voranreicherung) mit dem Nachweis-system nach Josefsen *et al.* (2004). Das BAX® System (DuPont Qualicon) war mit 51,3% positiver Proben (n=78) im Vergleich zu 57,7% mit der Quadruplex real-time PCR etwas unsensitiver und wies vor allem bei der Identifizierung von Isolaten von *C. lari* Unzulänglichkeiten auf, da nur bei zwei von 26 Isolaten eine Detektion möglich war.

Die Quadruplex real-time PCR eignet sich als spezifisches, sensibles und schnelles Nachweisverfahren für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* in Lebensmitteln. Das Ergebnis einschließlich der Speziesidentifizierung liegt innerhalb weniger Stunden nach 48-stündiger Voranreicherung der Probe vor. Das konventionelle Verfahren hingegen nimmt sechs bis acht Tage in Anspruch. Außerdem liefert die Quadruplex real-time PCR durch die Detektion von Mischinfektionen umfassendere Ergebnisse und erwies sich hinsichtlich der Speziesidentifizierung im Vergleich zum biochemischen Verfahren als zuverlässiger.

G. Summary

A quadruplex real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of the thermophilic *Campylobacter* species *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* in different foods such as poultry, meat, fish and mussels was established and validated for food products parallel to conventional diagnostics.

This assay is based on a published real-time PCR method for detection of *C. jejuni* and *C. coli*. On sequencing a section of subunit A of the gyrase gene of twelve strains of *C. lari*, primers and a probe for specific detection of *C. lari* were designed. The three *Campylobacter* specific assays were combined with an internal amplification control system to prevent false-negative results caused by inhibition. Labelling of the four probes with different fluorescent dyes allowed simultaneous detection of all four assays using an appropriate real-time PCR machine.

The inclusivity of the method was 100% for all three *Campylobacter*-specific assays. The exclusivity was 94.7% for the *C. jejuni*-specific assay because of weakly positive signals of a few non-target strains. The *C. coli*- and the *C. lari*-specific assays however showed an exclusivity of 100%.

The detection limit was determined via a dilution series of enriched pure cultures. The detection probability was 100% at a concentration of at least 1.1×10^3 cfu/ml of *C. jejuni*, 8.9×10^3 cfu/ml of *C. coli* and 4.5×10^2 cfu/ml of *C. lari*.

Repeated analysis of the same DNA dilution series resulted in minor variations of the Ct-values demonstrating the high precision of the assay. It also showed to be quite robust towards changes in the reagent concentration of $\pm 20\%$ and in the annealing temperature of $\pm 2^\circ\text{C}$. The Ct-values varied only about 1-2 cycles applying modified parameters.

For the analysis of food samples using the established quadruplex real-time PCR a selective enrichment was performed for 48 hours in microaerobic atmosphere analogue to the cultural method. DNA was extracted from 1 ml of the enriched sample using a simple boiling method, and 5 μl of DNA eluate were used as the template in the PCR.

The analysis of artificially contaminated food samples (three experiments with each species at three unique concentrations) allowed the detection of 1-10 cfu of *C. jejuni*, *C. coli* as well as *C. lari* in 25 g food even in the presence of a characteristic background flora and the respective two other *Campylobacter* species.

In all, 464 naturally contaminated food samples were analysed utilizing both the quadruplex real-time PCR and the conventional diagnostic method comprising cultural detection and biochemical identification of the species. The two methods yielded 84.9% concordant results regarding the detection of *Campylobacter* spp.. The quadruplex real-time PCR detected more positive samples (55.4%) than the conventional method (40.3%) which explains the

discrepant results. In terms of species identification, the quadruplex real-time PCR detected a high percentage of mixed infections (32.6%) analysing poultry samples whereas conventional diagnostics generally identified only one species.

The analysis of a portion of the samples (n=147) after only 24 hours of enrichment using the quadruplex real-time PCR resulted in the detection of 98.0% of the cultural positive samples and 80.8% of the PCR positive samples after 48 hours of enrichment.

The quadruplex real-time PCR was also applied for the differentiation of bacterial isolates of *Campylobacter* spp.. Of the 201 isolates analyzed 88.1% of the results corresponded with the conventional diagnostic method (api[®] campy kit). In 11.9% of the cases the biochemical method did not provide a definite result or yielded a false result. Sequencing the samples with discrepant results confirmed the findings of the quadruplex real-time PCR.

The established quadruplex real-time PCR was compared to two other real-time PCR assays for the detection of *Campylobacter* spp. analyzing food samples as well as bacterial isolates. The comparison to the detection method of Josefsen *et al.* (2004) showed high concordance of the results (96.6% after 48h enrichment (n=206) and 98.2% after 24h enrichment (n=56)). The BAX[®] system (DuPont Qualicon) was slightly less sensitive yielding 51.3% positive samples (n=78) compared to 57.7% with the quadruplex real-time PCR assay. It was unsuitable for the identification of *C. lari* isolates as it detected only two of 26 isolates.

In conclusion, the quadruplex real-time PCR is an appropriate tool for specific, sensitive and fast detection of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* in foods. Detection as well as species identification is provided within few hours following 48 hours of bacterial enrichment. In comparison, conventional diagnostics take up to eight days. Furthermore, the quadruplex real-time PCR assay gives more extensive and better defined information about the samples.

H. Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F. M., E. M. Nielsen, M. Madsen, and J. Engberg.** 1997. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2244-50.
- Abu-Halaweh, M., J. Bates, and B. K. Patel.** 2005. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Res Microbiol* **156**:107-14.
- Adam, D., H. W. Doerr, H. Link, and H. Lode.** 2004. Campylobacterenteritis. In D. Adam, H. W. Doerr, H. Link, and H. Lode (ed.), *Die Infektiologie*. Springer, Berlin.
- Adam, M., M. Contzen, S. Horlacher, and J. Rau.** 2006. [Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry meat and raw milk using PCR, conventional cultural methods and Fourier transform infrared spectroscopy]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **119**:209-15.
- Alderton, M. R., V. Korolik, P. J. Coloe, F. E. Dewhirst, and B. J. Paster.** 1995. *Campylobacter hyoilei* sp. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *Int J Syst Bacteriol* **45**:61-6.
- Allen, V. M., S. A. Bull, J. E. Corry, G. Domingue, F. Jørgensen, J. A. Frost, R. Whyte, A. Gonzalez, N. Elviss, and T. J. Humphrey.** 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *Int J Food Microbiol* **113**:54-61.
- Anderson, A., K. Pietsch, R. Zucker, A. Mayr, E. Müller-Hohe, D. Mäde, U. Busch, and I. Huber.** 2008. Validation of a duplex Realtime PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *Syst Appl Microbiol* (eingereicht)
- Anonymus.** 2006. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 3. Robert Koch-Institut.
- Anonymus.** 2007. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 3. Robert Koch-Institut.
- Anonymus.** 2008. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 3. Robert Koch-Institut.
- Anonymus.** 2004. Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 31. Robert Koch-Institut.
- Anonymus.** 2008b. *Campylobacter*. CDC Centers for Disease Control and Prevention. URL: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/campylobacter_gi.html.
- Anonymus.** 2007a. *Campylobacter jejuni*-Infektionen treten 2007 vermehrt auf. *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 36. Robert Koch-Institut.
- Anonymus.** 2000. *Campylobacter*. Fact Sheet N° 255. WHO World Health Organization. URL: <http://www.who.int>.
- Anonymus.** 2008a. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007. Robert Koch-Institut. Berlin.
- Anonymus.** 2006a. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Campylobacter* growing at 41,5°C (ISO 10272:2006). European Committee for Standardization, AFNOR, Paris, France.
- Anonymus.** 2005a. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions (ISO 22174:2005). European Committee for Standardization, AFNOR, Paris, France.

- Anonymus.** 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003). European Committee for Standardization, AFNOR, Paris, France.
- Atanassova, V., F. Reich, L. Beckmann, and G. Klein.** 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. in turkey meat from a slaughterhouse and in turkey meat retail products. FEMS Immunol Med Microbiol **49**:141-5.
- Aydin, F., H. I. Atabay, and M. Akan.** 2001. The isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* from domestic geese (*Anser anser*). J Appl Microbiol **90**:637-42.
- Benjamin, J., S. Leaper, R. J. Owen, and M. B. Skirrow.** 1983. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. Current Microbiology **8**:231-238.
- Best, E. L., E. J. Powell, C. Swift, K. A. Grant, and J. A. Frost.** 2003. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. FEMS Microbiol Lett **229**:237-41.
- Beumer, R. R., J. de Vries, and F. M. Rombouts.** 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. Int J Food Microbiol **15**:153-63.
- Birkenhead, D., P. M. Hawkey, J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, and P. Kite.** 1993. PCR for the detection and typing of campylobacters. Lett Appl Microbiol **17**:235-7.
- Bolton, F. J., and L. Robertson.** 1982. A selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni*. In D. G. Newell (ed.), *Campylobacter*, epidemiology, pathogenesis and biochemistry. Mtp Press, Lancaster, Boston.
- Boonmar, S., Y. Morita, M. Fujita, L. Sangsuk, K. Suthivarakom, P. Padungtod, S. Maruyama, H. Kabeya, M. Kato, K. Kozawa, S. Yamamoto, and H. Kimura.** 2007. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and gyr A gene mutation of *Campylobacter jejuni* isolates from humans and chickens in Thailand. Microbiol Immunol **51**:531-7.
- Borck, B., H. Stryhn, A. K. Ersbøll, and K. Pedersen.** 2002. Thermophilic *Campylobacter* spp. in turkey samples: evaluation of two automated enzyme immunoassays and conventional microbiological techniques. J Appl Microbiol **92**:574-82.
- Bourke, B., P. M. Sherman, D. Woodward, H. Lior, and V. L. Chan.** 1996. Pulsed-field gel electrophoresis indicates genotypic heterogeneity among *Campylobacter upsaliensis* strains. FEMS Microbiol Lett **143**:57-61.
- Breitenwieser, F.** 2007. Vergleich verschiedener molekularbiologischer Methoden zum Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. Bachelorarbeit. Technische Universität München.
- Bubert, A., L. Thompson, C. Lindhardt, and H.-G. Leusch.** 2004. Presented at the 23. Jenaer Symposium: *Campylobacter*-Infektionen, Bundesforschungsanstalt für Viruserkrankungen der Tiere, Standort Jena, Germany.
- Butzler, J. P., P. Dekeyser, M. Detrain, and F. Dehaen.** 1973. Related vibrio in stools. J Pediatr **82**:493-5.
- Carrique-Mas, J., Y. Andersson, M. Hjertqvist, A. Svensson, A. Torner, and J. Giesecke.** 2005. Risk factors for domestic sporadic campylobacteriosis among young children in Sweden. Scand J Infect Dis **37**:101-10.
- Chai, L. C., T. Robin, U. M. Ragavan, J. W. Gunsalam, F. A. Bakar, F. M. Ghazali, S. Radu, and M. P. Kumar.** 2007. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. Int J Food Microbiol **117**:106-11.
- Chart, H., D. Conway, J. A. Frost, and B. Rowe.** 1996. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni* grown in chickens. FEMS Microbiol Lett **145**:469-72.

- Che, Y., Y. Li, and M. Slavik.** 2001. Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled with an enzyme electrode. *Biosens Bioelectron* **16**:791-7.
- Cheng, Z., and M. W. Griffiths.** 2003. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *J Food Prot* **66**:1343-52.
- Corry, J. E., and H. I. Atabay.** 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:96S-114S.
- Corry, J. E. L., H. I. Atabay, S. J. Forsythe, and L. P. Mansfield.** 2003. Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacters, p. 271-316. *In* J. E. L. Corry, G. D. W. Curtis, and R. M. Baird (ed.), *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, vol. 37. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Costa, J. M., P. Ernault, M. Olivi, T. Gaillon, and K. Arar.** 2004. Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clin Biochem* **37**:930-2.
- De Boer, P., and T. Humphrey.** 1991. Comparison of methods for the isolation of thermophilic campylobacters from chicken products. *Microb. Health Dis* **4**:S43.
- Debretsion, A., T. Habtemariam, S. Wilson, D. Nganwa, and T. Yehualaeshet.** 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol Cell Probes* **21**:177-81.
- Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat, and P. Colin.** 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* **29**:406-10.
- Dingle, K. E., F. M. Colles, R. Ure, J. A. Wagenaar, B. Duim, F. J. Bolton, A. J. Fox, D. R. Wareing, and M. C. Maiden.** 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg Infect Dis* **8**:949-55.
- Dingle, K. E., F. M. Colles, D. R. Wareing, R. Ure, A. J. Fox, F. E. Bolton, H. J. Bootsma, R. J. Willems, R. Urwin, and M. C. Maiden.** 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **39**:14-23.
- Djordjevic, S. P., L. E. Unicomb, P. J. Adamson, L. Mickan, and R. Rios.** 2007. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J Clin Microbiol* **45**:102-8.
- Docherty, L., M. R. Adams, P. Patel, and J. McFadden.** 1996. The magnetic immunopolymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. *Lett Appl Microbiol* **22**:288-92.
- Donnison, A.** 2003. Isolation of thermotolerant *Campylobacter* - Review & methods for New Zealand laboratories. Client report. Ministry of Health. URL: <http://www.moh.govt.nz>.
- Duim, B., J. A. Wagenaar, J. R. Dijkstra, J. Goris, H. P. Endtz, and P. A. Vandamme.** 2004. Identification of distinct *Campylobacter lari* genogroups by amplified fragment length polymorphism and protein electrophoretic profiles. *Appl Environ Microbiol* **70**:18-24.
- Duim, B., T. M. Wassenaar, A. Rigter, and J. Wagenaar.** 1999. High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* **65**:2369-75.
- Ekdahl, K., B. Normann, and Y. Andersson.** 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis? *BMC Infect Dis* **5**:11.

- Elmer-Englhard, E., M. Knoll-Sauer, and H. Beck.** 1998. Presented at the 39. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany.
- Endtz, H. P., J. S. Vliegthart, P. Vandamme, H. W. Weverink, N. P. van den Braak, H. A. Verbrugh, and A. van Belkum.** 1997. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands. *Int J Food Microbiol* **34**:79-88.
- Englen, M. D., and P. J. Fedorka-Cray.** 2002. Evaluation of a commercial diagnostic PCR for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lett Appl Microbiol* **35**:353-6.
- Engvall, E. O., B. Brandstrom, L. Andersson, V. Baverud, G. Trowald-Wigh, and L. Englund.** 2003. Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* species in faecal samples from Swedish dogs. *Scand J Infect Dis* **35**:713-8.
- Escherich, T.** 1886. Beiträge zur Kenntniss der Darmbakterien III. Über das Vorkommen von Vibrionen im Darmcanal und den Stuhlgängen der Säuglinge. *Münchener Medizinische Wochenschrift* **33**:815-817; 833-835.
- Escherich, T.** 1884. Verhandlungen über Cholera im Ärztlichen Verein München. *Münchener Medizinische Wochenschrift* **31**:561-564.
- Eyers, M., S. Chapelle, G. Van Camp, H. Goossens, and R. De Wachter.** 1993. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J Clin Microbiol* **31**:3340-3.
- Fang, S. W., C. J. Yang, D. Y. Shih, C. C. Chou, and R. C. Yu.** 2006. Amplified fragment length polymorphism, serotyping, and quinolone resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from chicken-related samples and humans in Taiwan. *J Food Prot* **69**:775-83.
- Fermer, C., and E. O. Engvall.** 1999. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* **37**:3370-3.
- Friedman, C. R., R. M. Hoekstra, M. Samuel, R. Marcus, J. Bender, B. Shiferaw, S. Reddy, S. D. Ahuja, D. L. Helfrick, F. Hardnett, M. Carter, B. Anderson, and R. V. Tauxe.** 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* **38 Suppl 3**:S285-96.
- Frost, J. A., I. A. Gillespie, and S. J. O'Brien.** 2002. Public health implications of campylobacter outbreaks in England and Wales, 1995-9: epidemiological and microbiological investigations. *Epidemiol Infect* **128**:111-8.
- Frost, J. A., A. N. Oza, R. T. Thwaites, and B. Rowe.** 1998. Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* **36**:335-9.
- Garrity, G. M., J. A. Bell, and T. Lilburn.** 2005. Campylobacterales. In D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition, 2nd ed, vol. 2: *The Proteobacteria*. Springer, New York.
- Geller, P.** 2003. Persönliche Mitteilung. Tutorial Real-Time PCR. Abbott Diagnostics, Wiesbaden.
- Gentry-Weeks, C., H. J. Hutcheson, L. M. Kim, D. Bolte, J. Traub-Dargatz, P. Morley, B. Powers, and M. Jessen.** 2002. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* **40**:1487-92.
- Giesendorf, B. A., and W. G. Quint.** 1995. Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**:625-38.

- Gillespie, I. A., S. J. O'Brien, G. K. Adak, C. C. Tam, J. A. Frost, F. J. Bolton, and D. S. Tompkins.** 2003. Point source outbreaks of *Campylobacter jejuni* infection--are they more common than we think and what might cause them? *Epidemiol Infect* **130**:367-75.
- Godschalk, P. C., A. P. Heikema, M. Gilbert, T. Komagamine, C. W. Ang, J. Glerum, D. Brochu, J. Li, N. Yuki, B. C. Jacobs, A. van Belkum, and H. P. Endtz.** 2004. The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* **114**:1659-65.
- Gonzalez, I., K. A. Grant, P. T. Richardson, S. F. Park, and M. D. Collins.** 1997. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* **35**:759-63.
- Goossens, H., B. A. Giesendorf, P. Vandamme, L. Vlaes, C. Van den Borre, A. Koeken, W. G. Quint, W. Blomme, P. Hanicq, D. S. Koster, and et al.** 1995. Investigation of an outbreak of *Campylobacter upsaliensis* in day care centers in Brussels: analysis of relationships among isolates by phenotypic and genotypic typing methods. *J Infect Dis* **172**:1298-305.
- Goossens, H., B. Pot, L. Vlaes, C. Van den Borre, R. Van den Abbeele, C. Van Naelten, J. Levy, H. Cogniau, P. Marbehant, J. Verhoef, and et al.** 1990. Characterization and description of "*Campylobacter upsaliensis*" isolated from human feces. *J Clin Microbiol* **28**:1039-46.
- Gürtler, M., T. Alter, S. Kasimir, and K. Fehlhaber.** 2005. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. *Epidemiol Infect* **133**:1081-7.
- Ha, T. A., and T. Y. Pham.** 2006. Study of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli* contamination in raw food available in factories, schools, and hospital canteens in Hanoi, Vietnam. *Ann N Y Acad Sci* **1081**:262-5.
- Hald, B., and M. Madsen.** 1997. Healthy puppies and kittens as carriers of *Campylobacter* spp., with special reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J Clin Microbiol* **35**:3351-2.
- Harrington, C. S., L. Moran, A. M. Ridley, D. G. Newell, and R. H. Madden.** 2003. Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol* **95**:1321-33.
- Hazeleger, W. C., J. D. Janse, P. M. Koenraad, R. R. Beumer, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 1995. Temperature-dependent membrane fatty acid and cell physiology changes in coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **61**:2713-9.
- Hazeleger, W. C., J. A. Wouters, F. M. Rombouts, and T. Abee.** 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl Environ Microbiol* **64**:3917-22.
- Heuer, O. E., K. Pedersen, J. S. Andersen, and M. Madsen.** 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett Appl Microbiol* **33**:269-74.
- Hong, J., W. K. Jung, J. M. Kim, S. H. Kim, H. C. Koo, J. Ser, and Y. H. Park.** 2007. Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *J Food Prot* **70**:2015-22.
- Hoorfar, J., N. Cook, B. Malorny, M. Wagner, D. De Medici, A. Abdulmawjood, and P. Fach.** 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* **41**:5835.
- Hoorfar, J., B. Malorny, A. Abdulmawjood, N. Cook, M. Wagner, and P. Fach.** 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol* **42**:1863-8.

- Hoorfar, J., E. M. Nielsen, H. Stryhn, and S. Andersen.** 1999. Evaluation of two automated enzyme-immunoassays for detection of thermophilic campylobacters in faecal samples from cattle and swine. *J Microbiol Methods* **38**:101-6.
- Houng, H. S., O. Sethabutr, W. Nirdnoy, D. E. Katz, and L. W. Pang.** 2001. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* **40**:11-9.
- Hübner, P., S. Gautsch, T. Jemmi.** 2002. In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren. *Mitt Lebensm Hyg* **93**:118-139
- Humphrey, T., S. O'Brien, and M. Madsen.** 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int J Food Microbiol* **117**:237-57.
- Humphrey, T. J.** 1989. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. *J Appl Bacteriol* **66**:119-26.
- Hunt, J. M., C. Abeyta, and T. Tran.** 2000. Isolation of *Campylobacter* species from Food and Water. U. S. Food & Drug Administration.
URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html>.
- Hutchinson, D. N., and F. J. Bolton.** 1984. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J Clin Pathol* **37**:956-7.
- Iijima, Y., N. T. Asako, M. Aihara, and K. Hayashi.** 2004. Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol* **53**:617-22.
- Ioannidis, A., C. Nicolaou, N. J. Legakis, V. Ioannidou, E. Papavasileiou, A. Voyatzi, and S. Chatzipanagiotou.** 2006. Genotyping of human *Campylobacter jejuni* isolates in Greece by pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Diagn Ther* **10**:391-6.
- Jacobs-Reitsma, W., E. Samuëls, and J. Wagenaar.** 1999. Presented at the International Meeting on *Campylobacter*, Aarhus, Denmark.
- Jacobs-Reitsma, W., M. Van der Wal, M. Samuëls, and J. Wagenaar.** 2003. Presented at the International meeting on *Campylobacter*, Aarhus, Denmark.
- Jesse, T. W., M. D. Englen, L. G. Pittenger-Alley, and P. J. Fedorka-Cray.** 2006. Two distinct mutations in *gyrA* lead to ciprofloxacin and nalidixic acid resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from chickens and beef cattle. *J Appl Microbiol* **100**:682-8.
- Johnsen, G., H. Kruse, and M. Hofshagen.** 2006. Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* **101**:1130-9.
- Johnsen, G., H. Kruse, and M. Hofshagen.** 2006. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from broiler carcasses and slaughterhouse environment by amplified fragment length polymorphism. *Poult Sci* **85**:2278-84.
- Johnsen, G., H. Kruse, and M. Hofshagen.** 2007. Genotyping of thermotolerant *Campylobacter* from poultry slaughterhouse by amplified fragment length polymorphism. *J Appl Microbiol* **103**:271-9.
- Johnsen, G., K. Zimmerman, B. A. Lindstedt, T. Vardund, H. Herikstad, and G. Kapperud.** 2006. Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among cattle from south-western Norway and comparative genotyping of bovine and human isolates by amplified-fragment length polymorphism. *Acta Vet Scand* **48**:4.
- Jones, K.** 2001. Campylobacters in water, sewage and the environment. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:68S-79S.

- Josefsen, M. H., N. R. Jacobsen, and J. Hoorfar.** 2004. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Appl Environ Microbiol* **70**:3588-92.
- Josefsen, M. H., N. Cook, M. D`Agostino, F. Hansen, M. Wagner, K. Demnerova, A. E. Heuvelink, P. T. Tassios, H. Lindmark, V. Kmet, M. Barbanera, P. Fach, S. Loncarevic, and J. Hoorfar.** 2004a. Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant campylobacters in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol* **70**:4379-83.
- Karmali, M. A., A. E. Simor, M. Roscoe, P. C. Fleming, S. S. Smith, and J. Lane.** 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* **23**:456-9.
- Keller, J., B. Wieland, M. Wittwer, R. Stephan, and V. Perreten.** 2007. Distribution and genetic variability among *Campylobacter* spp. isolates from different animal species and humans in Switzerland. *Zoonoses Public Health* **54**:2-7.
- Ketley, J. M.** 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* **143**(Pt 1):5-21.
- Khan, I. U., and T. A. Edge.** 2007. Development of a novel triplex PCR assay for the detection and differentiation of thermophilic species of *Campylobacter* using 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region. *J Appl Microbiol* **103**:2561-9.
- Kiehl, W.** 2004. *Campylobacter jejuni* / Campylobacteriose. In N. Suttorp, M. Mielke, W. Kiehl, and B. Stück (ed.), *Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln*. Thieme, Stuttgart.
- Kinana, A. D., E. Cardinale, F. Tall, I. Bahsoun, J. M. Sire, B. Garin, S. Breurec, C. S. Boye, and J. D. Perrier-Gros-Claude.** 2006. Genetic diversity and quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from poultry in Senegal. *Appl Environ Microbiol* **72**:3309-13.
- King, E. O.** 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis* **101**:119-28.
- Kist, M.** 2006. *Campylobacter*. In F. Hofmann (ed.), *Handbuch der Infektionskrankheiten*, 2. Auflage. Verlagsgruppe Hühlig Jehle Rehm Unternehmensbereich ecomed, Landsberg.
- Kist, M.** 2002. Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **45**:497-506.
- Kist, M.** 1986. [Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A review of hitherto disregarded literature]. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* **261**:177-86.
- Klein, G., F. Reich, L. Beckmann, and V. Atanassova.** 2007. Quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in broilers during meat processing. *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**:267-73.
- Klena, J. D., C. T. Parker, K. Knibb, J. C. Ibbitt, P. M. Devane, S. T. Horn, W. G. Miller, and M. E. Konkel.** 2004. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol* **42**:5549-57.
- Koenraad, P. M. F. J., F. M. Rombouts, and S. H. W. Notermans.** 1997. Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: a review. *Water Environmental Research* **69**:52-63.
- Kokotovic, B., and S. L. On.** 1999. High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiol Lett* **173**:77-84.

- Konkel, M. E., S. A. Gray, B. J. Kim, S. G. Garvis, and J. Yoon.** 1999. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the cadF virulence gene and its product. *J Clin Microbiol* **37**:510-7.
- Konkel, M. E., B. J. Kim, V. Rivera-Amill, and S. G. Garvis.** 1999a. Identification of proteins required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Adv Exp Med Biol* **473**:215-24.
- Korczak, B. M., R. Stieber, S. Emler, A. P. Burnens, J. Frey, and P. Kuhnert.** 2006. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from rpoB sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:937-45.
- Kramer, J. M., J. A. Frost, F. J. Bolton, and D. R. Wareing.** 2000. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. *J Food Prot* **63**:1654-9.
- Kumar, A., R. K. Agarwal, K. N. Bhilegaonkar, B. R. Shome, and V. N. Bachhil.** 2001. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in vegetables. *Int J Food Microbiol* **67**:153-5.
- Kumar, R., S. K. Singh, A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, M. Meldgaard, and J. Wengel.** 1998. The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg Med Chem Lett* **8**:2219-22.
- Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, and J. Hedgpeth.** 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* **28**:655-61.
- Kwan, P. S., A. Birtles, F. J. Bolton, N. P. French, S. E. Robinson, L. S. Newbold, M. Upton, and A. J. Fox.** 2008. Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Appl Environ Microbiol* **74**:3626-33.
- LaGier, M. J., L. A. Joseph, T. V. Passaretti, K. A. Musser, and N. M. Cirino.** 2004. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol Cell Probes* **18**:275-82.
- Lamoureux, M., A. MacKay, S. Messier, I. Fliss, B. W. Blais, R. A. Holley, and R. E. Simard.** 1997. Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separation and microtitre hybridization. *J Appl Microbiol* **83**:641-51.
- Landt, O.** 2008. Persönliche Mitteilung. Tib Molbiol, Berlin.
- Lastovica, A. J., and M. Skirrow.** 2000. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC.
- Lazaro, B., J. Carcamo, A. Audicana, I. Perales, and A. Fernandez-Astorga.** 1999. Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **65**:4677-81.
- Lick, S., A. Mayr, M. Müller, A. Anderson, H. Hotzel, and I. Huber.** 2007. Konventionelle PCR- und Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter jejuni*, *coli* und *lari*: ein Überblick. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2**:161-170.
- Lienau, J. A., L. Ellerbroek, and G. Klein.** 2007. Tracing flock-related *Campylobacter* clones from broiler farms through slaughter to retail products by pulsed-field gel electrophoresis. *J Food Prot* **70**:536-42.
- Lim, D.** 1998. Microbiology. Second edition. WCB/McGraw-Hill, USA.
- Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen, and J. Stanley.** 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* **35**:2568-72.

- Lior, H., D. L. Woodward, J. A. Edgar, L. J. Laroche, and P. Gill.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* **15**:761-8.
- Litrup, E., M. Torpdahl, and E. M. Nielsen.** 2007. Multilocus sequence typing performed on *Campylobacter coli* isolates from humans, broilers, pigs and cattle originating in Denmark. *J Appl Microbiol* **103**:210-8.
- Logan, S. M., and T. J. Trust.** 1983. Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **42**:675-82.
- Lübeck, P. S., P. Wolffs, S. L. On, P. Ahrens, P. Rådström, and J. Hoorfar.** 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacter*s: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol* **69**:5664-9.
- Mackay, I. M.** 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* **10**:190-212.
- Mäde, D., R. Petersen, K. Trümper, R. Stark, and L. Grohmann.** 2004. In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* ssp. in food products. *Eur Food Res Technol* **219**:171-177.
- Mäde, D., and R. Stark.** 2000. Nachweis thermophiler *Campylobacter* in Lebensmitteln durch Polymerase-Kettenreaktion. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **51**: 1-32.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-5.
- Malorny, B., N. Cook, M. D'Agostino, D. De Medici, L. Croci, A. Abdulmawjood, P. Fach, R. Karpiskova, T. Aymerich, K. Kwaitek, J. Hoorfar, and B. Malorny.** 2004. Multicenter validation of PCR-based method for detection of *Salmonella* in chicken and pig samples. *J AOAC Int* **87**:861-6.
- Malorny, B., P. T. Tassios, P. Rådström, N. Cook, M. Wagner, and J. Hoorfar.** 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* **83**:39-48.
- Mansfield, L. S., and S. R. Abner.** 2000. Molecular mechanisms governing *Campylobacter* pathogenicity. *In* J. W. Cary, J. E. Linz, and D. Bhatnagar (ed.), *Microbial foodborne diseases - Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster.
- Mattick, K., K. Durham, G. Domingue, F. Jorgensen, M. Sen, D. W. Schaffner, and T. Humphrey.** 2003. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *Int J Food Microbiol* **85**:213-26.
- McClure, P., and C. Blackburn.** 2003. *Campylobacter* and *Arcobacter*. *In* C. Blackburn and P. McClure (ed.), *Foodborne Pathogens*. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- McFadyean, J., and S. Stockman.** 1909. Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part I: epizootic abortion in cattle. Her Majesty's Stationery Office **III**:Appendix D: 156.
- McKay, D., J. Fletcher, P. Cooper, and F. M. Thomson-Carter.** 2001. Comparison of two methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* **39**:1917-21.
- McKillip, J. L., and M. Drake.** 2004. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot* **67**:823-32.

- Mead, G. C., W. R. Hudson, and M. H. Hinton.** 1995. Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with campylobacter. *Epidemiol Infect* **115**:495-500.
- Medema, G. J., F. M. Schets, A. W. van de Giessen, and A. H. Havelaar.** 1992. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Appl Bacteriol* **72**:512-6.
- Meinersmann, R. J., C. M. Patton, G. M. Evins, I. K. Wachsmuth, and P. I. Fields.** 2002. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1789-97.
- Ménard, A., F. Datchet, V. Prouzet-Mauleon, M. Oleastro, and F. Mégraud.** 2005. Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* **11**:281-7.
- Michaud, S., S. Ménard, and R. D. Arbeit.** 2004. Campylobacteriosis, Eastern Townships, Quebec. *Emerg Infect Dis* **10**:1844-7.
- Mickan, L., R. Doyle, M. Valcanis, K. E. Dingle, L. Unicomb, and J. Lanser.** 2007. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from New South Wales, Australia. *J Appl Microbiol* **102**:144-52.
- Miller, W. G., M. D. Englen, S. Kathariou, I. V. Wesley, G. Wang, L. Pittenger-Alley, R. M. Siletz, W. Muraoka, P. J. Fedorka-Cray, and R. E. Mandrell.** 2006. Identification of host-associated alleles by multilocus sequence typing of *Campylobacter coli* strains from food animals. *Microbiology* **152**:245-55.
- Miller, W. G., S. L. On, G. Wang, S. Fontanoz, A. J. Lastovica, and R. E. Mandrell.** 2005. Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J Clin Microbiol* **43**:2315-29.
- Miller, W. G., C. T. Parker, S. Heath, and A. J. Lastovica.** 2007. Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the nap locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiol* **7**:11.
- Mills, S. D., W. C. Bradbury, and J. L. Penner.** 1986. Isolation and characterization of a common antigen in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol* **24**:69-75.
- Mølbak, K.** 1998. Zoonoses acquired when travelling abroad - travellers diarrhea. *Zoonose-Nyt*:6-8.
- Moore, J. E., D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, B. Lucey, M. Matsuda, D. A. McDowell, F. Megraud, B. C. Millar, R. O'Mahony, L. O'Riordan, M. O'Rourke, J. R. Rao, P. J. Rooney, A. Sails, and P. Whyte.** 2005. *Campylobacter*. *Vet Res* **36**:351-82.
- Murphy, C., C. Carroll, and K. N. Jordan.** 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* **100**:623-32.
- Nachamkin, I., K. Bohachick, and C. M. Patton.** 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **31**:1531-6.
- Nachamkin, I., H. Ung, and C. M. Patton.** 1996. Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *J Clin Microbiol* **34**:277-81.
- Nayak, R., T. M. Stewart, and M. S. Nawaz.** 2005. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol Cell Probes* **19**:187-93.
- Nebola, M., and I. Steinhauserova.** 2006. PFGE and PCR/RFLP typing of *Campylobacter jejuni* strains from poultry. *Br Poult Sci* **47**:456-61.

- Neimann, J., J. Engberg, K. Mølbak, and H. C. Wegener.** 2003. A case-control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark. *Epidemiol Infect* **130**:353-66.
- Newell, D. G., L. A. Frost, B. Duim, J. A. Wagenaar, R. H. Madden, J. v. d. Plas, and S. L. W. On.** 2000. New Developments in the Subtyping of *Campylobacter* Species. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC.
- Nielsen, E. M.** 2002. Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Lett Appl Microbiol* **35**:85-9.
- Nielsen, E. M., J. Engberg, and M. Madsen.** 1997. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**:47-56.
- Nogva, H. K., A. Bergh, A. Holck, and K. Rudi.** 2000. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **66**:4029-36.
- Nylen, G., F. Dunstan, S. R. Palmer, Y. Andersson, F. Bager, J. Cowden, G. Feierl, Y. Galloway, G. Kapperud, F. Megraud, K. Mølbak, L. R. Petersen, and P. Ruutu.** 2002. The seasonal distribution of campylobacter infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol Infect* **128**:383-90.
- Oliveira, T. C., S. Barbut, and M. W. Griffiths.** 2005. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int J Food Microbiol* **104**:105-11.
- Owen, R. J., A. Fayos, J. Hernandez, and A. Lastovica.** 1993. PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of DNA sequence diversity of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and allied species. *Mol Cell Probes* **7**:471-80.
- Oyarzabal, M., I. V. Wesley, J. M. Barbaree, L. H. Lauerman, and D. E. Conner.** 1997. Specific detection of *Campylobacter lari* by PCR. *Journal of Microbiological Methods* **29**:97-102.
- Oyofa, B. A., S. A. Thornton, D. H. Burr, T. J. Trust, O. R. Pavlovskis, and P. Guerry.** 1992. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**:2613-9.
- Park, C. E., and G. W. Sanders.** 1992. Occurrence of thermotolerant campylobacters in fresh vegetables sold at farmers' outdoor markets and supermarkets. *Can J Microbiol* **38**:313-6.
- Park, C. E., and G. W. Sanders.** 1991. Presented at the 5th International Workshop on *Campylobacter* Infections, National Institute of Nutrition, Mexico.
- Park, S. F.** 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* **74**:177-88.
- Patton, C. M., T. J. Barrett, and G. K. Morris.** 1985. Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* **22**:558-65.
- Penner, J. L., and J. N. Hennessy.** 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol* **12**:732-7.
- Penner, J. L., J. N. Hennessy, and R. V. Congi.** 1983. Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur J Clin Microbiol* **2**:378-83.

- Perelle, S., M. Josefsen, J. Hoorfar, F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach.** 2004. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Mol Cell Probes* **18**:321-7.
- Persson, S., and K. E. Olsen.** 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* **54**:1043-7.
- Pezzotti, G., A. Serafin, I. Luzzi, R. Mioni, M. Milan, and R. Perin.** 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int J Food Microbiol* **82**:281-7.
- Pless, P., H. Gruber, and J. Köfer.** 2004. On the hygienic status of domestic fish and fish products. *Food Safety Assurance and Veterinary Public Health* **2**:383-385.
- Posch, J., G. Feierl, G. Wuest, W. Sixl, S. Schmidt, D. Haas, F. F. Reinthaler, and E. Marth.** 2006. Transmission of *Campylobacter* spp. in a poultry slaughterhouse and genetic characterisation of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Br Poult Sci* **47**:286-93.
- Praakle-Amin, K., M. Roasto, H. Korkeala, and M. L. Hanninen.** 2007. PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *Int J Food Microbiol* **114**:105-12.
- Purnell, G., K. L. Mattick, and T. J. Humphrey.** 2003. The use of hot wash treatments to reduce the number of pathogenic and spoilage bacteria on raw retail poultry. *Journal of Food Engineering* **62**:29-36.
- Qian, H., E. Pang, Q. Du, J. Chang, J. Dong, S. L. Toh, F. K. Ng, A. L. Tan, and J. Kwang.** 2008. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. *Appl Environ Microbiol* **74**:833-9.
- Ragimbeau, C., G. Salvat, P. Colin, and G. Ermel.** 1998. Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J Appl Microbiol* **85**:829-38.
- Rasmussen, H. N., J. E. Olsen, K. Jorgensen, and O. F. Rasmussen.** 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. *Lett Appl Microbiol* **23**:363-6.
- Rasmussen, R.** 2001. Quantification on the LightCycler. In S. Meurer, C. Wittwer, and K.-i. Nakagawara (ed.), *Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications*, Berlin Heidelberg New York.
- Reynisson, E., M. H. Josefsen, M. Krause, and J. Hoorfar.** 2006. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *J Microbiol Methods* **66**:206-16.
- Ridsdale, J. A., H. I. Atabay, and J. E. L. Corry.** 1998. Prevalence of campylobacters and arcobacters in ducks at the abattoir. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **85**:567-573.
- Robinson, D. A.** 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J (Clin Res Ed)* **282**:1584.
- Rodin, S., A. F. Andersson, V. Wirta, L. Eriksson, M. Ljungström, B. Björkholm, H. Lindmark, and L. Engstrand.** 2008. Performance of a 70-mer oligonucleotide microarray for genotyping of *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* **8**:73.
- Rollins, D. M., and R. R. Colwell.** 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* **52**:531-8.

- Rönner, A. C., and H. Lindmark.** 2007. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by real-time PCR. *J Food Prot* **70**:1373-8.
- Rudi, K., H. K. Høidal, T. Katla, B. K. Johansen, J. Nordal, and K. S. Jakobsen.** 2004. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* **70**:790-7.
- Sachs, L.** 1997. *Angewandte Statistik*. 8. Auflage. Springer, Berlin
- Sails, A. D., A. J. Fox, F. J. Bolton, D. R. Wareing, and D. L. Greenway.** 2003. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* **69**:1383-90.
- Sails, A. D., B. Swaminathan, and P. I. Fields.** 2003. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* **41**:4058-67.
- Samosornsuk, W., M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa, and S. Yamasaki.** 2007. Evaluation of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. *Microbiol Immunol* **51**:909-17.
- Schonberg-Norio, D., J. Takkinen, M. L. Hanninen, M. L. Katila, S. S. Kaukoranta, L. Mattila, and H. Rautelin.** 2004. Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerg Infect Dis* **10**:1474-7.
- Schouls, L. M., S. Reulen, B. Duim, J. A. Wagenaar, R. J. Willems, K. E. Dingle, F. M. Colles, and J. D. Van Embden.** 2003. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J Clin Microbiol* **41**:15-26.
- Schulze, F., E. Bartelt, and W. Müller.** 2000. *Campylobacter*. In K. Sachse and P. Gallien (ed.), *Molekularbiologische Nachweismethoden ausgewählter Zoonoseerreger*. bgvv Hefte.
- Sebald, M., and M. Veron.** 1963. [Base Dna Content And Classification Of Vibrios.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **105**:897-910.
- Sekizuka, T., T. Yokoi, O. Murayama, B. C. Millar, J. Moore, and M. Matsuda.** 2005. A newly constructed primer pair for the PCR amplification, cloning and sequencing of the flagellin (flaA) gene from isolates of urease-negative *Campylobacter lari*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**:113-20.
- Siemer, B. L., C. S. Harrington, E. M. Nielsen, B. Borck, N. L. Nielsen, J. Engberg, and S. L. On.** 2004. Genetic relatedness among *Campylobacter jejuni* serotyped isolates of diverse origin as determined by numerical analysis of amplified fragment length polymorphism (AFLP) profiles. *J Appl Microbiol* **96**:795-802.
- Simor, A. E., and L. Wilcox.** 1987. Enteritis associated with *Campylobacter laridis*. *J Clin Microbiol* **25**:10-2.
- Skirrow, M. B.** 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br Med J* **2**:9-11.
- Smith, T., and M. S. Taylor.** 1919. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *Journal of Experimental Medicine* **30**:299-312.
- Sonnevend, A., V. O. Rotimi, J. Kolodziejek, A. Usmani, N. Nowotny, and T. Pal.** 2006. High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol* **55**:1533-8.

- Stanley, J., C. Jones, A. Burnens, and R. J. Owen.** 1994. Distinct genotypes of human and canine isolates of *Campylobacter upsaliensis* determined by 16S rRNA gene typing and plasmid profiling. *J Clin Microbiol* **32**:1788-94.
- Stanley, K., R. Cunningham, and K. Jones.** 1998. Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *J Appl Microbiol* **85**:187-91.
- Stanley, K., and K. Jones.** 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol* **94 Suppl**:104S-113S.
- Stein, M.** 2004. Querschnittsgelähmt durch *Campylobacter jejuni*: das Guillain-Barré-Syndrom. Europäisches Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften (EU. L. E.) URL: <http://www.das-eule.de/guillain-barre.html>.
- Steinbrueckner, B., G. Haerter, K. Pelz, and M. Kist.** 1999. Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. *FEMS Microbiol Lett* **179**:227-32.
- Stern, N. J., K. L. Hiatt, G. A. Alfredsson, K. G. Kristinsson, J. Reiersen, H. Hardardottir, H. Briem, E. Gunnarsson, F. Georgsson, R. Lowman, E. Berndtson, A. M. Lammerding, G. M. Paoli, and M. T. Musgrove.** 2003. *Campylobacter* spp. in Icelandic poultry operations and human disease. *Epidemiol Infect* **130**:23-32.
- Stonnet, V., and J. L. Guesdon.** 1993. *Campylobacter jejuni*: specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **7**:337-44.
- Stucki, U., J. Frey, J. Nicolet, and A. P. Burnens.** 1995. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J Clin Microbiol* **33**:855-9.
- Suerbaum, S., M. Lohregel, A. Sonnevend, F. Ruberg, and M. Kist.** 2001. Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **183**:2553-9.
- Talibart, R., M. Denis, A. Castillo, J. M. Cappelier, and G. Ermel.** 2000. Survival and recovery of viable but noncultivable forms of *Campylobacter* in aqueous microcosm. *Int J Food Microbiol* **55**:263-7.
- Taylor, D. E., and N. Chang.** 1987. Immunoblot and enzyme-linked immunosorbent assays of *Campylobacter* major outer-membrane protein and application to the differentiation of *Campylobacter* species. *Mol Cell Probes* **1**:261-74.
- Taylor, D. E., and A. S. Chau.** 1997. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrA* gene from *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ATCC 27374 and characterization of ciprofloxacin-resistant laboratory and clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:665-71.
- Teunis, P., A. Havelaar, J. Vliegthart, and G. Roessink.** 1997. Risk Assessment of *Campylobacter* species in shellfish: identifying the unknown *Water Science and Technology* **35**:29-34.
- Thelwell, N., S. Millington, A. Solinas, J. Booth, and T. Brown.** 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res* **28**:3752-61.
- Thomas, C., H. Gibson, D. J. Hill, and M. Mabey.** 1999. *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **85**:168S-177S.
- Totten, P. A., C. M. Patton, F. C. Tenover, T. J. Barrett, W. E. Stamm, A. G. Steigerwalt, J. Y. Lin, K. K. Holmes, and D. J. Brenner.** 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J Clin Microbiol* **25**:1747-52.

- Trigo, D., J. Kleer, and G. Hildebrandt.** 2002. Presented at the 43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany.
- Uyttendaele, M., S. van Boxstael, and J. Debevere.** 1999. PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *Int J Food Microbiol* **52**:85-95.
- Van Camp, G., H. Fierens, P. Van Damme, H. Goosens, A. Huyghebaert, and R. De Wachter.** 1993. Identification of enteropathogenetic species by oligonucleotide probes and polymerase chain reaction based on 16S rRNA genes. *Syst Appl Microbiol* **16**:30-36.
- van de Giessen, A. W., C. J. Heuvelman, T. Abee, and W. C. Hazeleger.** 1996. Experimental studies on the infectivity of non-culturable forms of *Campylobacter* spp. in chicks and mice. *Epidemiol Infect* **117**:463-70.
- van de Giessen, A. W., J. J. Tilburg, W. S. Ritmeester, and J. van der Plas.** 1998. Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol Infect* **121**:57-66.
- van Duynhoven, Y. T., C. M. de Jager, L. M. Kortbeek, H. Vennema, M. P. Koopmans, F. van Leusden, W. H. van der Poel, and M. J. van den Broek.** 2005. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol Infect* **133**:9-21.
- Van Looveren, M., G. Daube, L. De Zutter, J. M. Dumont, C. Lammens, M. Wijdooghe, P. Vandamme, M. Jouret, M. Cornelis, and H. Goossens.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **48**:235-40.
- van Vliet, A. H., and J. M. Ketley.** 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*:45S-56S.
- Vandamme, P.** 2000. Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, DC.
- Vandamme, P., F. E. Dewhirst, B. J. Paster, and S. L. W. On.** 2005. Campylobacteraceae. *In* D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Edition, Vol. 2: *The Proteobacteria*. Springer, New York.
- Vandamme, P., L. J. Van Doorn, S. T. al Rashid, W. G. Quint, J. van der Plas, V. L. Chan, and S. L. On.** 1997. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1055-60.
- Waldenström, J., S. L. On, R. Ottvall, D. Hasselquist, and B. Olsen.** 2007. Species diversity of campylobacteria in a wild bird community in Sweden. *J Appl Microbiol* **102**:424-32.
- Waller, D. F., and S. A. Ogata.** 2000. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Appl Environ Microbiol* **66**:4115-8.
- Wang, G., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. L. Woodward, and F. G. Rodgers.** 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* **40**:4744-7.
- Wang, R.-F., M. Slavik, and W.-W. Cao.** 1992. A rapid PCR method for direct detection of low numbers of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **1**:101-108.
- Wang, Y., W. M. Huang, and D. E. Taylor.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* *gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:457-63.

- Wassenaar, T. M.** 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin Microbiol Rev **10**:466-76.
- Wassenaar, T. M., B. N. Fry, A. J. Lastovica, J. A. Wagenaar, P. J. Coloe, and B. Duim.** 2000. Genetic characterization of *Campylobacter jejuni* O:41 isolates in relation with Guillain-Barre syndrome. J Clin Microbiol **38**:874-6.
- Wassenaar, T. M., and D. G. Newell.** 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol **66**:1-9.
- Wegmüller, B., J. Lüthy, and U. Candrian.** 1993. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. Appl Environ Microbiol **59**:2161-5.
- Weijtens, M. J., R. D. Reinders, H. A. Urlings, and J. Van der Plas.** 1999. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. J Appl Microbiol **86**:63-70.
- White, P. L., A. R. Baker, and W. O. James.** 1997. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. Rev Sci Tech **16**:525-41.
- Williams, L. K., A. McMeechan, T. Baalham, L. Ward, T. J. Humphrey, and F. Jorgensen.** 2008. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from broiler chicken-related samples using BAX PCR and conventional International Organization for Standardization culture. J Food Prot **71**:835-8.
- Wilson, G., and L. B. Aitchison.** 2007. The use of a combined enrichment-filtration technique for the isolation of *Campylobacter* spp. from clinical samples. Clin Microbiol Infect **13**:643-4.
- Wilson, I. G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol **63**:3741-51.
- Wilson, I. G., and J. E. Moore.** 1996. Presence of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in shellfish. Epidemiol Infect **116**:147-53.
- Winters, D. K., and M. F. Slavik.** 1995. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. Mol Cell Probes **9**:307-10.
- Wittwer, C.** 2001. Introduction. In C. W. Stefan Meurer, Kan-ichi Nakagawara (ed.), Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Wolffs, P., B. Norling, J. Hoofar, M. Griffiths, and P. Rådstrøm.** 2005. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR. Appl Environ Microbiol **71**:5759-64.
- Wolffs, P., B. Norling, and P. Rådstrøm.** 2005. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. J Microbiol Methods **60**:315-23.
- Wolffs, P. F., K. Glencross, B. Norling, and M. W. Griffiths.** 2007. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. Int J Food Microbiol **117**:50-4.
- Yamazaki-Matsune, W., M. Taguchi, K. Seto, R. Kawahara, K. Kawatsu, Y. Kumeda, M. Kitazato, M. Nukina, N. Misawa, and T. Tsukamoto.** 2007. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. J Med Microbiol **56**:1467-73.
- Yan, W., N. Chang, and D. E. Taylor.** 1991. Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. J Infect Dis **163**:1068-72.

- Yang, C., Y. Jiang, K. Huang, C. Zhu, and Y. Yin.** 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**:265-71.
- Yu, L. S., J. Uknalis, and S. I. Tu.** 2001. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *J Immunol Methods* **256**:11-8.
- Zhao, J. R., Y. J. Bai, Q. H. Zhang, Y. Wan, D. Li, and X. J. Yan.** 2005. Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World J Gastroenterol* **11**:508-10.
- Ziprin, R. L., R. E. Droleskey, M. E. Hume, and R. B. Harvey.** 2003. Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks. *Avian Dis* **47**:753-8.
- Ziprin, R. L., and R. B. Harvey.** 2004. Inability of cecal microflora to promote reversion of viable nonculturable *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis* **48**:647-50

ANHANG

	G G T G C C A A A T T T A T T G C T T A A T G G A T C A A G T G G T A T A G C T G T T G G T A T G G C T A C A A A T A T										Majority																				
	130			140			150			160			170			180															
71	.	.	T	A	T	A	.	.	.	T	A	G	.	.	.	C	.	C. jej. 3642
107	A	T	A	.	.	.	C	.	T	T	.	.	A	.	.	G	.	.	C. coli*
94	C. l. 156
108	C. l. 1807
105	C. l. 11375
88	C. l. 72
117	C. l. 1745
77	C. l. 2910
107	C. l. 19512
100	C. l. 23947
121	A	T	T	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	C. l. 18294
106	T	.	T	A	A	T	.	.	C. l. L1880-1
108	A	T	T	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	C. l. L1880-2
121	A	T	T	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	C. l. L2979

	C C C A C C G C A T A G T T T A A A T G A A T T A A T C G A T G G G C T T T T A T A T T T A A T A G A C A A T A A A G A										Majority																										
	190			200			210			220			230			240																					
131	.	.	.	T	G	.	G	.	A	.	.	.	A	G	C	.	T	.	T	G	.	.	C. jej. 3642				
167	T	.	T	C	.	T	.	C	.	G	C	.	T	G	.	A	.	.	.	A	.	.	G	.	.	G	C	.	T	C	.	.	C. coli*
154	C. l. 156					
168	C. l. 1807					
165	C. l. 11375					
148	C. l. 72						
177	C. l. 1745						
137	C. l. 2910						
167	C. l. 19512						
160	C. l. 23947						
181	T	.	T	G	C	.	T	.	T	.	T	.	G	C	.	T	.	.	.	T	.	.	.	A	.	.	C. l. 18294				
166	A	.	.	A	T	.	G	.	.	C. l. L1880-1				
168	T	.	T	.	.	.	C	.	G	.	.	G	C	.	T	.	T	.	T	.	G	C	.	T	.	.	T	.	T	.	A	.	C. l. L1880-2				
181	T	.	T	G	.	.	G	C	.	T	.	C	T	.	.	T	.	T	.	G	C	.	T	.	.	.	A	.	C. l. L2979				

ANHANG

	A A G T T C T T T A G A A G A A A T A A T G C A G T T T A T C A A A G G G C C T G A T T T T C C A A C T G G T G G G A T Majority																																			
	250		260		270		280		290		300																									
191	T	G	C	A	A	G	C	.	.	.	G	.	T	T	.	A	A	.	.	A	.	.	A	.	.	C. jej. 3642	
227	T	G	C	.	A	G	T	T	.	G	.	.	.	A	C. coli*		
214	C. l. 156	
228	C. l. 1807	
225	C. l. 11375	
208	C. l. 72	
237	C. l. 1745	
197	C. l. 2910	
227	A	C. l. 19512	
220	C. l. 23947	
241	T	G	C	A	A	G	C	C	.	.	.	A	C	.	T	C. l. 18294
226	.	G	C	A	A	.	A	.	.	C	.	.	C	C	.	.	A	.	C. l. L1880-1	
228	T	G	C	A	A	G	A	.	T	.	.	T	C	.	.	T	.	.	C	.	C. l. L1880-2	
241	T	G	C	A	A	G	C	C	.	.	T	C	.	.	T	.	.	C	.	C. l. L2979	

	T A T A T A T G G T A A A A A G G C A T T A T A G A A G C T T A T C G C A C T G G T C G T G G T A G G G T T A A A G T Majority																																			
	310		320		330		340		350		360																									
251	A	.	.	T	T	A	.	G	.	.	C	.	C	.	G	.	.	.	C. jej. 3642		
287	A	.	T	.	.	.	C	C	A	.	G	.	.	A	.	A	.	A	C. coli*
274	C. l. 156
288	C. l. 1807
285	C. l. 11375
268	C. l. 72
297	C. l. 1745
257	C. l. 2910
287	C. l. 19512
280	C. l. 23947
301	.	.	T	.	T	T	.	.	.	C	.	T	.	A	A	.	.	.	C. l. 18294	
286	A	C	.	C	.	.	A	.	A	.	.	C. l. L1880-1	
288	.	.	C	.	T	.	.	.	G	.	T	C	.	.	.	A	A	C. l. L1880-2	
301	.	.	C	.	T	C	.	T	.	A	A	C. l. L2979	

ANHANG

	A A G A G C T A A A C C C A T A T A G A A A A A G A G C A A A T A A G A C A T A A T A G T C A T C G A T G A A C T Majority																																							
	370					380					390					400					410					420														
311	G	C	C	T	T	A	G	A	T	G	.	T	.	T	.	T	.	A	.	.	.	G	.	C. jej. 3642
347	T	.	C	A	T	C	T	.	C	.	T	.	A	C. coli*	
334	C. l. 156
348	C. l. 1807
345	C. l. 11375
328	C. l. 72
357	C. l. 1745
317	C. l. 2910
347	T	A	.	T	.	C. l. 19512
340	C. l. 23947
361	.	.	.	A	T	T	T	.	T	.	C	.	.	.	A	C. l. 18294	
346	.	G	T	T	T	.	T	.	.	.	A	.	A	C. l. L1880-1	
348	.	.	A	T	T	T	T	.	T	.	T	.	A	.	A	C. l. L1880-2	
361	.	.	A	T	T	.	.	.	T	T	.	T	.	C	.	.	A	C. l. L2979	

	T C C T T A T C A A A C C A A T A A A G C A A G A T T G A T A - G A G C A A A T T G C T G A T T T A G C C A A A G A A A Majority																																							
	430					440					450					460					470					480														
371	T	.	G	C	.	T	.	-	.	.	G	.	.	.	A	.	G	C	.	T	.	T	T	C. jej. 3642	
407	.	.	A	.	.	G	.	.	T	.	.	.	C	.	C	.	-	.	A	A	.	G	C	.	T	.	T	A	C. coli*	
394	-	C. l. 156
408	-	C. l. 1807
405	-	C. l. 11375
388	-	C. l. 72
417	-	C. l. 1745
377	-	C. l. 2910
407	T	-	C. l. 19512
400	-	C. l. 23947
421	T	A	.	-	A	C	.	T	.	T	C. l. 18294	
406	-	A	T	A	C. l. L1880-1	
408	T	A	C	.	T	.	T	C. l. L1880-2	
421	T	.	C	A	.	-	A	C	.	T	.	T	C. l. L2979	

ANHANG

	A G C A A A T T G A A G G T A T T G C T G A A G T T A G A G A T G A A A G C G A T A G A G A A G G A A T T C G T G T A G										Majority																																
	490			500			510			520			530			540																											
430	A	.	A	T	A	G	.	A	.	.	A	C	.	C	.	T	.	C. jej. 3642	
466	C	.	.	.	A	.	.	.	T	A	G	.	T	T	.	C. coli*	
453	C. l. 156
467	C. l. 1807
464	C. l. 11375
447	C. l. 72
476	C. l. 1745
436	C. l. 2910
466	.	A	G	C. l. 19512	
459	C. l. 23947
480	.	A	C	G	.	T	G	.	C. l. 18294	
465	.	A	A	.	.	.	A	C	.	C. l. L1880-1	
468	.	A	C	.	.	.	C	G	.	T	C	.	C. l. L1880-2		
480	.	A	C	G	.	T	C	.	G	.	C. l. L2979	

	T A A T T G A G C T A A A C G C G A T G C T A T G A G - T G A G A T A G T T T T A A A T A A T T T A T T T A A A T C T										Majority																																
	550			560			570			580			590			600																											
490	.	T	.	A	.	.	T	.	.	.	T	.	G	C. jej. 3642
526	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	G	.	G	C. coli*	
513	A	.	C. l. 156	
527	C. l. 1807	
524	C. l. 11375	
507	C. l. 72	
536	A	.	C. l. 1745	
496	A	.	C. l. 2910	
526	A	.	C. l. 19512		
519	A	.	C. l. 23947		
540	.	G	A	G	C. l. 18294		
525	.	T	.	A	.	.	A	T	.	.	G	.	.	T	.	A	C. l. L1880-1		
528	G	C	T	.	G	.	G	C	.	T	.	C. l. L1880-2		
540	.	G	A	G	C. l. L2979		

In den nachfolgenden Tabellen sind die unter D.2.2.2 dargestellten Ergebnisse der Untersuchung von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen der drei *Campylobacter* Spezies einzeln aufgeführt.

Tabelle 55 Keimzahlen und Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. jejuni* DSMZ 4688

Verdünnungsstufe	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	6,4E+07	22,45	5,6E+07	23,08	6,4E+07	22,41
-2	6,4E+06	26,10	5,6E+06	27,01	6,4E+06	27,34
-3	6,4E+05	28,44	5,6E+05	28,45	6,4E+05	31,24
-4	6,4E+04	31,58	5,6E+04	32,12	6,4E+04	33,40
-5	6,4E+03	34,42	5,6E+03	34,62	6,4E+03	36,25
-6	6,4E+02	37,50	5,6E+02	37,73	6,4E+02	38,24
-7	6,4E+01	42,96	5,6E+01	No Ct	6,4E+01	No Ct
-8	6,4E+00	No Ct	5,6E+00	No Ct	6,4E+00	No Ct
-9	6,4E-01	No Ct	5,6E-01	No Ct	6,4E-01	No Ct
Verdünnungsstufe	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	1,1E+08	23,68	8,4E+07	26,93	3,3E+07	23,40
-2	1,1E+07	29,61	8,4E+06	28,82	3,3E+06	26,97
-3	1,1E+06	29,18	8,4E+05	29,28	3,3E+05	28,88
-4	1,1E+05	32,81	8,4E+04	33,78	3,3E+04	32,20
-5	1,1E+04	35,33	8,4E+03	36,70	3,3E+03	35,62
-6	1,1E+03	37,52	8,4E+02	40,34	3,3E+02	38,67
-7	1,1E+02	No Ct	8,4E+01	No Ct	3,3E+01	No Ct
-8	1,1E+01	No Ct	8,4E+00	No Ct	3,3E+00	No Ct
-9	1,1E+00	No Ct	8,4E-01	No Ct	3,3E-01	No Ct

Tabelle 56 Keimzahlen und Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. coli* DSMZ 4689

Verdünnungsstufe	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	1,2E+08	19,26	4,4E+07	19,32	8,9E+07	23,57
-2	1,2E+07	24,87	4,4E+06	27,15	8,9E+06	25,46
-3	1,2E+06	27,76	4,4E+05	27,93	8,9E+05	26,23
-4	1,2E+05	31,81	4,4E+04	33,56	8,9E+04	30,51
-5	1,2E+04	36,94	4,4E+03	43,70	8,9E+03	35,69
-6	1,2E+03	43,25	4,4E+02	No Ct	8,9E+02	No Ct
-7	1,2E+02	No Ct	4,4E+01	No Ct	8,9E+01	No Ct
-8	1,2E+01	No Ct	4,4E+00	No Ct	8,9E+00	No Ct
-9	1,2E+00	No Ct	4,4E-01	No Ct	8,9E-01	No Ct
Verdünnungsstufe	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	6,0E+07	20,31	6,4E+07	19,81	1,9E+07	26,31
-2	6,0E+06	23,77	6,4E+06	22,31	1,9E+06	27,30
-3	6,0E+05	26,58	6,4E+05	24,23	1,9E+05	26,42
-4	6,0E+04	30,59	6,4E+04	29,19	1,9E+04	30,24
-5	6,0E+03	35,08	6,4E+03	32,99	1,9E+03	33,77
-6	6,0E+02	No Ct	6,4E+02	38,40	1,9E+02	35,71
-7	6,0E+01	No Ct	6,4E+01	No Ct	1,9E+01	No Ct
-8	6,0E+00	No Ct	6,4E+00	No Ct	1,9E+00	No Ct
-9	6,0E-01	No Ct	6,4E-01	No Ct	1,9E-01	No Ct

Tabelle 57 Keimzahlen und Ct-Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen von dezimalen Verdünnungsreihen von Reinkulturen von *C. lari* CCUG 23947

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
Verdünnungsstufe	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	4,8E+07	27,95	5,8E+07	25,31	4,5E+07	No Ct
-2	4,8E+06	26,90	5,8E+06	24,96	4,5E+06	28,12
-3	4,8E+05	27,01	5,8E+05	26,48	4,5E+05	27,27
-4	4,8E+04	29,69	5,8E+04	29,92	4,5E+04	30,16
-5	4,8E+03	33,11	5,8E+03	33,35	4,5E+03	33,59
-6	4,8E+02	36,50	5,8E+02	36,69	4,5E+02	36,64
-7	4,8E+01	40,30	5,8E+01	43,46	4,5E+01	No Ct
-8	4,8E+00	No Ct	5,8E+00	No Ct	4,5E+00	No Ct
-9	4,8E-01	No Ct	5,8E-01	No Ct	4,5E-01	No Ct
	Versuch 4		Versuch 5		Versuch 6	
Verdünnungsstufe	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)	Keimzahl (KbE/ml)	Ct-Wert (Mittelwert aus 2 Replikaten)
-1	1,5E+08	19,75	2,2E+07	25,98	1,4E+07	28,64
-2	1,5E+07	24,15	2,2E+06	27,90	1,4E+06	28,02
-3	1,5E+06	27,71	2,2E+05	25,81	1,4E+05	26,93
-4	1,5E+05	31,44	2,2E+04	28,77	1,4E+04	30,64
-5	1,5E+04	35,36	2,2E+03	34,13	1,4E+03	34,36
-6	1,5E+03	37,10	2,2E+02	36,30	1,4E+02	38,72
-7	1,5E+02	41,61	2,2E+01	No Ct	1,4E+01	No Ct
-8	1,5E+01	No Ct	2,2E+00	No Ct	1,4E+00	No Ct
-9	1,5E+00	No Ct	2,2E-01	No Ct	1,4E-01	No Ct

Die vorliegende Arbeit wurde am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim während meiner Tätigkeit als Projektmitarbeiterin im Sachgebiet S5 Umweltmikrobiologie und im Sachgebiet S7 Infektiologie/Molekularbiologie angefertigt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Prof. Dr. Johann Bauer für die angenehme Betreuung dieser Arbeit und für seine hilfreichen Anregungen,

Dr. Ingrid Huber für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, die stets gewährten Hilfestellungen, die fachlichen Diskussionen, die konstruktive Kritik an meiner Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen,

Prof. Dr. Christiane Höller und Dr. Ulrich Busch für die Unterstützung und die Befürwortung dieser Arbeit,

meinen Kolleginnen aus dem F+E Labor der Molekularbiologie für die Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung und für die beratende Unterstützung während dieser Arbeit,

den Kolleginnen aus dem Labor für Lebensmittelmikrobiologie, insbesondere Diana Thäringen, für die Überlassung von Probenmaterial und die äußerst zuverlässige Zusammenarbeit,

meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Arbeit unterstützt und immer wieder bestärkt haben und vor allem Guido, der mir positive Energie und die notwendige Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit gab.