

6. ZUSAMMENFASSUNG

Über die lebensmittelhygienische Bedeutung von Geflügel als Reservoir für den neben Salmonellen am häufigsten isolierten humanpathogenen Enteritiserreger *Campylobacter jejuni* existieren zahlreiche Untersuchungen. Dagegen sind die Erkenntnisse über die pathogene und möglicherweise lebensmittelhygienische Bedeutung sowie über die Verbreitung von Bakterien der Gattung *Arcobacter* noch sehr begrenzt. Aufgrund ihrer engen genetischen Verwandtschaft und der zahlreichen phänotypischen Gemeinsamkeiten wurden die beiden Gattungen *Campylobacter* und *Arcobacter* in der Familie *Campylobacteraceae* vereinigt.

Da die Identifizierung und Differenzierung von Bakterien der Gattung *Arcobacter* aufgrund fehlender standardisierter Systeme Schwierigkeiten bereiten, ist nicht ausgeschlossen, daß *Arcobacter*-Infektionen unerkant bleiben.

In der vorliegenden Studie wurden Bakterien der Familie *Campylobacteraceae* aus frisch geschlachteten Broilern isoliert. Einfache, schnell durchzuführende phäno- und genotypische Methoden wurden auf ihre Eignung zur Identifizierung und Differenzierung dieser Isolate getestet. Dabei wurden die folgenden Ergebnisse erarbeitet

1. Aus Haut- und Caecumproben von 106 (62 %) der 170 untersuchten, nicht eviszerierten Broiler konnten Bakterien der Familie *Campylobacteraceae* isoliert werden. Von den insgesamt 119 Isolaten gehörten 30, die von 23 Broilern aus drei verschiedenen Herden stammten, zur Gattung *Campylobacter*. Dagegen gehörten 89 Isolate von 89 Tieren aus 15 verschiedenen Herden zur Gattung *Arcobacter*. Von sechs Broilern (3,5 %) wurden sowohl *Arcobacter* als auch *Campylobacter* zur selben Zeit, jedoch von unterschiedlichen Lokalisationen isoliert.
2. Mit Hilfe des standardisierten API CAMPY[®] Systems wurden 13 Isolate als *C. jejuni* Biotyp 1 und 17 Isolate als *C. jejuni* Biotyp 2 identifiziert. Insgesamt ließen sich für die *C. jejuni*-Isolate 17 API-Profile unterscheiden. Die 89 aerotoleranten Isolate wurden mittels API CAMPY[®] zu 47 % als *C. cryaerophila*, zu 5 % als *C. coli* und zu 48 % nur auf Genusebene erkannt. Für diese Isolate wurden 19 API-Profile unterschieden. Durch zusätzliche Wachstums- und Toleranztests konnten alle aerotoleranten Isolate phänotypisch der Spezies *A. butzleri* zugeordnet werden.

- 3 Im Agardiffusionstest zeigten sich alle *C. jejuni* 1- und *C. jejuni* 2-Isolate resistent gegen Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Cefazolin, Tetracyclin und Minocyclin. Die *C. jejuni* 1-Isolate waren zusätzlich resistent gegenüber Nalidixinsäure. Für die *Arcobacter*-Isolate konnten insgesamt 13 verschiedene Resistenzmuster dargestellt werden. Vorherrschend waren die Unempfindlichkeit gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Cefazolin und Ampicillin, während Resistenzen gegenüber Nalidixinsäure, Chloramphenicol, Clindamycin seltener vorkamen. Alle *Campylobacter*- und *Arcobacter*-Isolate zeigten sich empfindlich gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika
- 4 Die Plasmidisolierungsrate betrug für *Campylobacter* 100 %, für *Arcobacter* 24 %, wobei die Isolate jeweils nur ein Plasmid trugen. Die Plasmidanalyse (Plasmidprofile, Restriktionsanalyse der Plasmide) zeigte für *Campylobacter* zwei unterschiedliche Plasmidtypen von 52 und 45 kbp, die mit Hilfe einer *tet(O)*-Gensonde als Tc-Resistenzplasmide identifiziert werden konnten. Die 2,0 bis 5,0 kbp großen Plasmide der *Arcobacter*-Isolate, die keine Resistenzeigenschaften kodierten, ließen sich vier unterschiedlichen Typen zuordnen.
- 5 Alle getesteten Verfahren ließen sich für Bakterien der Familie *Campylobacteraceae* anwenden, waren einfach durchzuführen und konnten abhängig von der Methode nach acht bis 48 Stunden ausgewertet werden. Die affinitätschromatographische Plasmidreinigung bot in Bezug auf die Durchführbarkeit sowie die Reinheit und Weiterverwendbarkeit der Plasmide für *Campylobacter* und *Arcobacter* deutliche Vorteile gegenüber der alkalischen Denaturierung. Für die Unterscheidung von Plasmiden ähnlicher Größe und die exakte Bestimmung der Plasmidgrößen war die Restriktionsanalyse den einfachen Plasmidmustern überlegen. Die Resultate der Plasmidanalyse waren über den Untersuchungszeitraum stabil und reproduzierbar.
- 6 Die biochemische Differenzierung mit API CAMPY® erwies sich sowohl für *Campylobacter* als auch für *Arcobacter* als die Einzelmethode mit dem höchsten Diskriminatorischen Index ($D = 0,94$ für *Campylobacter*, $D = 0,90$ für *Arcobacter*), zeigte jedoch deutliche Mängel in der Identifizierung von *Arcobacter* auf Genus- und Speziesebene. Die Resistenzmuster besaßen für die *Campylobacter*-Isolate mit einem D -Wert von 0,51 geringere diskriminatorische Kraft als für die *Arcobacter*-Isolate ($D = 0,78$). Die Plasmidanalyse, die hier erstmalig für *Arcobacter* angewandt wurde, erreichte einen D -Wert von 0,40. Für *Campylobacter* betrug der D -Wert der Plasmidanalyse 0,54. Im Gegensatz zu *Campylobacter* ließ sich für *Arcobacter* der D -Wert durch Kombination der verschiedenen Methoden steigern. Die beste Unterscheidung der *Arcobacter*-Isolate ermöglichte die Kombination aller Methoden ($D = 0,99$).

Summary

Bettina Harraß

Identification and characterization of bacteria of the family *Campylobacteraceae* isolated from freshly slaughtered broiler chickens: biochemical characteristics, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis

Campylobacter jejuni is next to *Salmonella* one of the most common enteric pathogens causing acute bacterial gastroenteritis in man. Poultry has been reported to be a major source of *Campylobacter* infections. However, information about aerotolerant bacteria of the genus *Arcobacter*, their distribution and pathogenicity as well as their possible importance to food hygiene is still rare. Because of their close genotypic relationship as well as their numerous phenotypic similarities, *Arcobacters* and *Campylobacters* have been assigned to the family *Campylobacteraceae*.

Due to the lack of standardized systems for the identification and differentiation of *Arcobacters* it is not unlikely that *Arcobacter*-infections still remain unrecognized.

The purpose of this study was to isolate bacteria of the family *Campylobacteraceae* from freshly slaughtered broiler chickens and to examine simple and fast phenotypic and genotypic methods for identifying and characterizing these isolates. The following results were obtained.

- 1 A total of 170 unviscerated broiler chickens were investigated in this study. From skin- and caecum-samples of 106 (62 %) animals 119 isolates belonging to the family *Campylobacteraceae* were obtained. Of these isolates 30 belonged to the genus *Campylobacter*. They were obtained from 23 broiler chickens of three different flocks. The remaining 89 isolates from 89 animals of 15 different flocks were assigned to the genus *Arcobacter*. In six cases (3,5 %) *Campylobacters* and *Arcobacters* were isolated from different localizations of the same animal at the same time.
- 2 The standardized API CAMPY® system identified 13 isolates as *C. jejuni* biotype 1 and 17 isolates as *C. jejuni* biotype 2. A total of 17 different API profiles was obtained for the 30 *C. jejuni* isolates. The 89 aerotolerant isolates exhibited 19 different API profiles. Of these isolates 42 (47 %) were recognized with API CAMPY® as *C. cryaerophila* and 4 (5 %) as *C. coli*, whereas 43 (48 %) were identified only to the genus level. Additional growth- and tolerance-tests led to the phenotypic diagnosis *A. butzleri* for all 89 aerotolerant isolates.

3. Antimicrobial resistance testing was performed by agar diffusion method. Resistances to sulfamethoxazol/trimethoprim, cefazolin, tetracycline and minocycline were observed in all *C. jejuni* 1 and *C. jejuni* 2 isolates. In addition, all *C. jejuni* 1 isolates were resistant to nalidixic acid. A total of 13 different resistance patterns was detected in the *Arcobacter* isolates. Resistances to sulfamethoxazol/trimethoprim, cefazolin and ampicillin were predominant, whereas resistances to nalidixic acid, chloramphenicol and clindamycin were observed less often. All *Campylobacters* and *Arcobacters* were susceptible to aminoglycosides.
4. Plasmids were found in 100 % of the *Campylobacter* isolates and in 24 % of the *Arcobacter* isolates. None of the isolates carried more than one plasmid. Plasmid analysis (plasmid profiles, restriction digests of the plasmids) confirmed the presence of two different plasmids of 52 kbp and 45 kbp in the *Campylobacter* isolates. Both plasmids hybridized with a *ter(O)*-probe and thus were identified as Tc-resistance plasmids. The four different types of *Arcobacter* plasmids which did not encode antibiotic resistance properties ranged in size between 2,0 kbp and 5,0 kbp.
5. All phenotypic and genotypic methods tested proved to be simple, fast and generally applicable to bacteria of the family *Campylobacteraceae*. Depending on the procedure, results were obtained within eight to 48 hours. Referring to purity and further use of the plasmids as well as applicability for *Campylobacters* and *Arcobacters* plasmid purification using affinity chromatography offered distinct advantages to alkaline denaturation methods. Restriction digests of the plasmids were superior to simple plasmid profiles with regard to distinguishing plasmids of similar size as well as exactly measuring the sizes of the plasmids. Results of plasmid analysis were stable and reproducible during this study.
6. Biochemical differentiation with API CAMPY[®] proved to be the single method with the highest discriminatory index for *Campylobacter* isolates ($D = 0,94$) as well as for *Arcobacter* isolates ($D = 0,90$). However, correct identification of *Arcobacter* isolates on genus and species level was not possible with API CAMPY[®]. Antimicrobial resistance testing yielded distinctly lower D values for *Campylobacters* ($D = 0,51$) as well as *Arcobacters* ($D = 0,78$). Plasmid analysis - having been performed for the first time in *Arcobacters* - resulted in $D = 0,40$ for *Arcobacters* and $D = 0,54$ for *Campylobacters*. Combination of all methods increased the discriminatory index for *Arcobacter* isolates ($D = 0,99$), but not for *Campylobacter* isolates.