

**Tierärztliche Hochschule Hannover**  
**Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit**

**Qualitativer und quantitativer Nachweis**  
**von *Arcobacter* spp.**  
**in der Putenschlachtung**

INAUGURAL – DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von  
Volker Kessen  
Addrup

Hannover 2009

Wissenschaftliche Betreuung: Dr. Dr. habil. V. Atanassova

Univ.- Prof. Dr. G. Klein

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. G. Klein

2. Gutachter: PD Dr. G. Glünder

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2009

Ergebnisse dieser Dissertation wurden auf der CHRO 2007 in Rotterdam (Niederlande, Poster) und im International Journal of Food Microbiology veröffentlicht.

**Meinem Vater**



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
2	Literaturübersicht.....	13
2.1	Historischer Überblick.....	13
2.2	Taxonomie und Einordnung .....	14
2.3	Morphologie und Physiologie von <i>Arcobacter</i> spp. ....	16
2.3.1	Morphologie .....	16
2.3.2	Koloniemorphologie .....	16
2.3.3	Wachstum von <i>Arcobacter</i> .....	16
2.4	Identifizierung.....	18
2.4.1	Biochemische Eigenschaften .....	18
2.5	Molekularbiologische Differenzierung.....	20
2.6	Tenazität: Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit .....	21
2.6.1	Organische Säuren .....	24
2.7	Epidemiologie.....	25
2.7.1	Natürliche Reservoirs .....	25
2.7.1.1	Umwelt.....	25
2.7.1.2	Säugetiere.....	26
2.7.2	<i>Arcobacter</i> -Infektion des Menschen.....	29
2.7.2.1	Pathogenität und Virulenzfaktoren .....	30
2.7.2.2	Erkrankung und Therapie.....	31
2.7.2.2.1	Antibiotikaresistenzen.....	32
2.8	<i>Arcobacter</i> : Vorkommen im Wirtschaftsgeflügel .....	33
2.8.1	<i>Arcobacter</i> in der Putenmast .....	35
2.8.2	Transport, Schlachtung, Verarbeitung .....	35
2.8.2.1	Vorfang und Transport.....	35
2.8.2.2	<i>Arcobacter</i> in der Putenschlachtung .....	36
2.8.2.3	<i>Arcobacter</i> - Prävalenz bei Geflügelfleisch im Einzelhandel.....	40
2.9	Risikomanagement .....	40
3	Material und Methode.....	42

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1	Probenahme .....	42
3.2	Bearbeitung der Proben im Labor .....	43
3.2.1	Qualitative Untersuchung der Proben mit Selektivanreicherung .....	44
3.2.2	Quantitative Untersuchung und Nachweisrate aus der quantitativen Untersuchung.....	44
3.3	Inkubation .....	46
3.4	Bestätigung <i>Arcobacter</i> -verdächtiger Kolonien.....	46
3.5	Cryokonservierung .....	47
3.6	Nachweis von <i>Arcobacter</i> spp. mittels molekulargenetischer Methoden .....	48
3.6.1	multiplex – PCR .....	48
3.6.1.1	DNA – Isolierung.....	48
3.6.1.2	Durchführung von PCR und Elektrophorese .....	49
3.6.2	Dye Terminator Cycle Sequencing.....	50
3.7	Material und Geräte .....	52
3.7.1	Flüssige Medien.....	55
3.7.2	Feste Nährmedien .....	57
4	Ergebnisse.....	59
4.1	Qualitative Untersuchung nach Anreicherung.....	59
4.1.1	Ergebnisse nach der Mikrobiologischen Untersuchung .....	59
4.1.2	Ergebnisse nach Überprüfung mittels PCR .....	60
4.1.3	Ergebnisse nach Überprüfung mittels Sequenzierung.....	61
4.2	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung.....	62
4.2.1	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung nach der Mikrobiologischen Untersuchung.....	62
4.2.2	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung nach Überprüfung mittels PCR.....	63
4.2.3	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung nach Überprüfung mittels Sequenzierung .....	64
4.3	<i>Arcobacter</i> - Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen.....	65
4.3.1	Qualitative <i>Arcobacter</i> -Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der mikrobiologischen Untersuchung.....	65

4.3.2	Qualitative <i>Arcobacter</i> - Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der PCR.....	66
4.3.3	Qualitative <i>Arcobacter</i> - Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Sequenzierung .....	66
4.3.4	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Mikrobiologischen Untersuchung.....	67
4.3.5	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels PCR .....	68
4.3.6	Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels Sequenzierung.....	69
4.4	Vergleichende Darstellung der <i>Arcobacter</i> - positiven Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden .....	70
4.4.1	Vergleichende Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden.....	70
4.4.2	Vergleichende Darstellung der Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden.....	72
4.5	Vergleichende Monatsdarstellung der qualitativ nachgewiesenen <i>Arcobacter</i> -positiven Proben nach den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren.....	73
4.6	Vergleichende Monatsdarstellung der Nachweisrate über die quantitative Untersuchung nachgewiesenen <i>Arcobacter</i> - positiven Proben nach den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren.....	75
4.7	Quantifizierung von <i>Arcobacter</i> spp. ....	76
4.8	Speziesdifferenzierung von <i>Arcobacter</i> aus den Putenproben .....	78



## Inhaltsverzeichnis

---

5	Diskussion .....	82
5.1	Begründung der eingesetzten Methoden zur Isolierung, Quantifizierung und Differenzierung von <i>Arcobacter</i> spp.....	83
5.2	Auswahl der Probeentnahmestationen.....	85
5.3	<i>Arcobacter</i> - Spezies in der Putenschlachtung .....	86
5.4	Prävalenz bzw. Quantifizierung von <i>Arcobacter</i> in der Putenschlachtung und -verarbeitung .....	88
5.5	Ausblick.....	90
6	Schlussfolgerungen.....	92
7	Zusammenfassung .....	93
8	Summary.....	95
9	Tabellenverzeichnis .....	97
10	Abbildungsverzeichnis .....	101
11	Literaturverzeichnis .....	103
12	Anhang.....	127
13	Danksagung .....	137

## Abkürzungsverzeichnis

A. =	<i>Arcobacter</i>
Aqua dest. =	destilliertes Wasser
BfR =	Bundesinstitut für Risikobewertung
C. =	<i>Campylobacter</i>
Cand. =	Candidatus
CAT =	Cefoperazone, Amphotericin B, Teicoplanin
mCCDA =	modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar
CHO – Zelllinien =	Chinese Hamster Ovary – Zelllinien
DNA =	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs =	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTCS =	dye terminator cycle sequencing
EDTA =	Ethylendiamintetraacetat
EMJH medium =	Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris - Medium
et al. =	et alii
HACCP =	Hazard Analysis and Critical Control Point
ISO =	International Organization for Standardization
KbE =	Kolonie bildende Einheiten
LKW =	Lastkraftwagen
n =	Stichprobenumfang
NaCl =	Natrium Chlorid
PCR =	Polymerase Chain Reaction
SAS =	Statistics Analysis Systems
spp. =	Spezies
ssp. =	Subspezies
SSM =	semi – solid blood free selectivity – motility

# 1 Einleitung

Das Genus *Arcobacter* (A.) der Familie *Campylobacteriaceae* hat in den letzten Jahren hinsichtlich seiner Rolle als möglicher Zoonose-Erreger an Bedeutung gewonnen. Seitdem die wichtigsten Spezies (spp.) *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* mit einer Erkrankung des Menschen oder der Tiere – und hier vor allem mit gastrointestinalen Symptomen - in Verbindung gebracht werden konnten, wurden diese Erreger als Quelle einer möglichen Gesundheitsgefährdung intensiver untersucht. Die Prävalenz von menschlichen *Arcobacter*-Infektionen wurde in der Vergangenheit aufgrund nicht standardisierter Nachweisverfahren und fehlender Routinediagnostik sehr wahrscheinlich unterschätzt. Zur Zeit ist nur wenig über das weltweite Vorkommen von *Arcobacter* spp. bekannt und die Potenz als durch Lebensmittel- oder Wasser übertragene Zoonose, der Verbreitungsweg und die Pathogenitätsmechanismen dieser Erreger sind weitestgehend unklar.

*Arcobacter* sind in der Umwelt weit verbreitet. Das wichtigste Reservoir stellt jegliche Form von Wasser dar. Im Gegensatz zu der Kontamination von Geflügelkarkassen mit *Campylobacter*, welche häufig in der Darmflora der Tiere gefunden werden, ist die Belastung der Geflügeloberflächen mit *Arcobacter* spp. nicht auf diese Weise zu erklären, da dieses Bakterium nicht oder nur selten im Magen-Darm-Trakt der Tiere nachgewiesen wird. Hierbei spielt vielmehr der Eintrag dieses Erregers durch den Schlachtprozess aus dem Umfeld eine große Rolle. Das so kontaminierte Produkt gelangt in die Lebensmittelkette und stellt dort bei unsachgemäßem Umgang eine nicht zu unterschätzende Gesundheitsgefährdung dar.

Puten sind bisher noch nicht systematisch auf die Prävalenz von *Arcobacter* spp. untersucht worden. Eine wissenschaftliche Studie mit einer zielorientierten Untersuchung an bestimmten Schlachtstationen bietet die Möglichkeit, Kontaminationen aus der Umgebung aufzudecken, den Einfluss auf die Karkassen- und Geflügelteilstück- Hygiene und die Belastung des für den Verbraucher bestimmten Endproduktes zu analysieren.

Somit ist die Feststellung möglicher Gefahrenquellen und Risiken im automatisierten Prozess der Putenschlachtung, welche zu einer Belastung mit *Arcobacter* spp. führen könnten, eine wichtige Handlungsbasis, um die Gefahr einer *Arcobacter*-Infektion für den Menschen zu senken. In dieser Studie wurden Putenproben an verschiedenen Stationen des Schlachtprozesses gesammelt, um weitere Daten von *Arcobacter*-Prävalenzen an den einzelnen Stationen zu erhalten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Historischer Überblick

In einer 1886 veröffentlichten Publikation beschrieb THEODOR ESCHERICH ein spiralförmiges Bakterium aus dem Stuhl und Darm von an Durchfall erkrankten jungen Katzen. Er nannte diese Keime daraufhin „*Vibrio felinus*“. Im gleichen Jahr berichtete er über den Nachweis ähnlicher Spirillen im Colon von Säuglingen, die an der „cholera infantum“ gestorben waren. Dabei beobachtete er spiralförmige Organismen in den Stuhlproben durchfallerkrankter Säuglinge unter dem Mikroskop, eine Kultivierung misslang jedoch. Trotz zunehmender Häufigkeit derartiger Befunde wurde den spiralförmigen Bakterien vorerst keine Rolle in der Ätiologie der enteralen Erkrankungen zugesprochen. Im Jahr 1913 beschrieben die Tierärzte MC FADYEAN und STOCKMAN ein unbekanntes, *Vibrio*-ähnliches Bakterium, das sich im Zusammenhang mit dem seuchenhaften Verwerfen der Schafe aus abortierten Lämmern isolieren ließ. In den darauffolgenden Jahren konnten im Rahmen der Untersuchung des infektiösen Aborts der Rinder morphologisch ähnliche, spiralförmige Bakterien aus dem Magen- und Darminhalt abortierter Rinderföten angezüchtet werden, die man als „*Vibrio fetus*“ bezeichnete (SMITH und TAYLOR, 1919). JONES et al. (1931) isolierten *Vibrio fetus*-ähnliche Bakterien aus dem Jejunum von Kälbern und Rindern, die an Winterdysenterie erkrankt waren, und nannten diese ihrem Fundort entsprechend *Vibrio jejuni*. 1944 gelang die Isolierung *Vibrio*-ähnlicher Bakterien aus dem Colon von an Dysenterie erkrankten Schweinen, worauf diese Mikroorganismen die Bezeichnung *Vibrio coli* erhielten (DOYLE, 1944). 1946 konnte LEVY den Erreger zum ersten Mal mikroskopisch in Stuhl- und Blutproben von an Enteritis erkrankten Menschen nachweisen, eine Kultivierung kam jedoch nicht zustande. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit mit *V. coli* und *V. jejuni* nannte er diese Erreger *V. fetus*. Die erstmalige Isolierung von *Vibrio fetus* aus dem Blut und dem Geschlechtstrakt schwangerer Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen wurde im darauffolgenden Jahr, d.h. 1947, von VINCENT und Mitarbeitern beschrieben. KING berichtete 1957 über einen aus dem Blut enteritiskranker Patienten isolierten Erreger, der zwar mit den morphologischen Merkmalen des von VINCENT et al. (1947) als *V. fetus* bezeichneten Organismus übereinstimmte, jedoch ein Wachstumsoptimum bei höheren Temperaturen aufwies. Aus diesem Grund gab man diesen

mit den Vibrionen verwandten Bakterien den Namen „related vibrios“. Einige Vibrionenstämme wurden später aufgrund des unterschiedlichen Guanosin-Cytosin-Gehaltes der DNA zu einer neuen Gattung zusammengefasst und unter dem Namen *Campylobacter* (griech. campylos = gebogen, bacterion = Stäbchen) geführt (SÉBALD und VÉRON, 1963). 1972 gelang erstmalig die Isolierung des Erregers aus Stuhlproben (DEKEYSER et al., 1972). Fünf Jahre darauf ermöglichte die Einführung antibiotikahaltiger Selektivnährböden durch SKIRROW (1977) die Isolation der Keime in der Routinediagnostik und führte somit zur Erkennung von *Campylobacter* als Erreger menschlicher Gastroenteritiden (BUTZLER et al., 1973).

## 2.2 Taxonomie und Einordnung

Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den jeweiligen Bakterienspezies wurden zu Beginn der taxonomischen Einteilung anhand morphologischer und biochemischer Eigenschaften beurteilt. Erst durch die Möglichkeit des phylogenetischen Vergleiches von Genomsequenzen und der Einführung der Molekularbiologie wurden neue taxonomische Einteilungen ermöglicht.

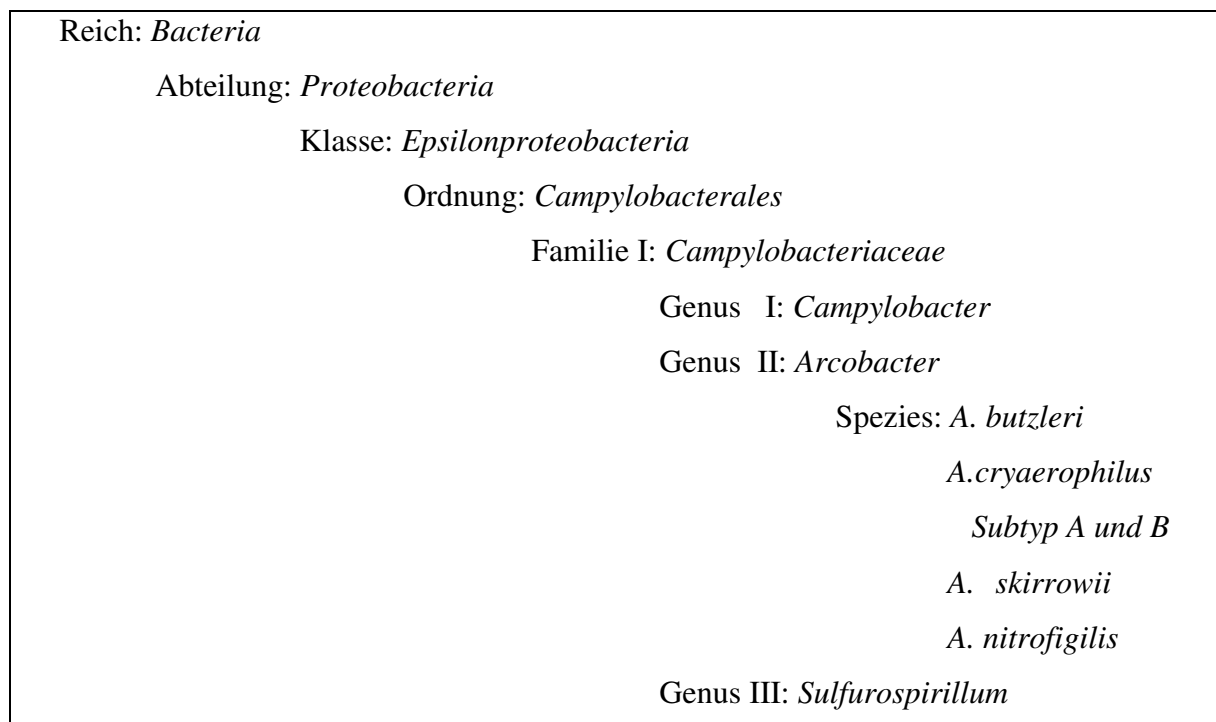
Die Historie von *Arcobacter* spp. ist mit der Entstehung der Spezies *Campylobacter* gleichzusetzen. Erst im Jahre 1977 fanden ELLIS et al. in abortierten Rinderfeten mikroaerophile s-förmig gewundene Stäbchen, welche morphologisch mit der Spezies *Campylobacter* übereinstimmten, sich allerdings von bekannten *Campylobacter*-Stämmen durch ihre Fähigkeit in der Anwesenheit von atmosphärischem Sauerstoff oder mikroaerophilen Bedingungen bei 30°C zu wachsen (NEILL et al., 1978) unterschieden. Aufgrund dieser Tatsache bekamen sie den Namen „aerotolerante *Campylobacter*“. 1985 machten NEILL et al. den Vorschlag, dass alle aerotoleranten Stämme einer neuen Spezies innerhalb des Genus *Campylobacter* zugeordnet werden sollten. Dadurch entstand *Campylobacter cryaerophila*.

Nach intensiven Untersuchungen mittels Immunotypisierung und SDS-PAGE von zellulären Proteinen, Fettsäureanalysen und DNA-Hybridisations-Studien wurden die aerotoleranten *Campylobacter* als Genus *Arcobacter* neu beschrieben (VANDAMME et al., 1991). So entstanden aus *C. butzleri* *A. butzleri* und weitere durch DNA-DNA-Hybridisation identifizierte Spezies: *A. cryaerophilus* mit den Subgruppen A und B, *A. nitrofigilis* und

*A. skirrowii*. Eine Übersicht über die Taxonomie von *Arcobacter* spp. ist in der Abbildung 1 dargestellt.

*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* sind die einzigen Spezies welche mit humanen gastrointestinalen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Des Weiteren spielen diese Erreger auch eine große Rolle bei Erkrankungen von Tieren, wo Fruchtbarkeitsstörungen und Aborte im Vordergrund stehen.

Drei weitere Spezies wurden im Laufe der Zeit entdeckt. Bisher wurden sie aber nicht im Zusammenhang mit Erkrankungen von Menschen oder Tieren isoliert: *A. cibarius*, *A. halophilus*, *Cand. A. sulfidicus* (WIRSEN et al., 2002; HOUF et al., 2005; DONACHIE et al., 2005). ON et al. (2003) entdeckten eine neue *A.-skirrowii-like* Spezies in abortierten Schweine-Feten und in Enten-Kloaken.



**Abb. 1:** Taxonomie von *Arcobacter* spp.

## **2.3 Morphologie und Physiologie von *Arcobacter* spp.**

### **2.3.1 Morphologie**

*Arcobacter* Spezies sind Gram-negative Stäbchen. Sie erscheinen als helikale oder S-förmig gewundene, nicht-sporulierende Stäbchen mit einer Länge von 0,5 bis 3  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 0,2 bis 0,9  $\mu\text{m}$ . Die meisten Spezies sind monotrich, uni- oder bipolar begeißelt, wodurch sie ihre typische korkenzieherförmige Beweglichkeit bekommen. Es kommen allerdings auch Spezies mit einer Länge von bis zu 20  $\mu\text{m}$  vor (WESLEY, 1994).

### **2.3.2 Koloniemorphologie**

Die Morphologie von *Arcobacter* spp. ist sehr unterschiedlich und ist abhängig von dem verwendeten Kultivierungsmedium. Auf Blut-basierenden Agarmedien zeigen sich nach drei Tagen der Inkubation kleine runde, weiße, grau-weiße oder gräuliche Kolonien mit einem Durchmesser von 2-4 mm (COLLINS et al., 1996). Die Kolonien sind generell unpigmentiert und konvex mit einem glatten Rand.

Auf m-CCDA-Platten (modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar) gewachsene Kolonien sind nach zwei Tagen Bebrütungszeit bei einer Temperatur von 25°C im Durchmesser 1-2 mm groß, haben eine runde Form und einen glatten Rand. Die Farbe variiert von grau bis grau-glasig. Die Kolonien wirken oberflächlich glänzend und sind im Querschnitt nicht erhaben.

### **2.3.3 Wachstum von *Arcobacter***

Obwohl keine standardisierten Methoden zur Isolation von *Arcobacter*-Spezies existieren, wurden trotzdem einige identische Verfahrensweisen entwickelt. Viele Methoden basieren auf den Isolationsverfahren der verwandten *Campylobacter* spp. (CORRY et al., 2003). Der hauptsächliche Unterschied zwischen *Arcobacter* und *Campylobacter* ist die Fähigkeit von *Arcobacter*, unter aeroben Bedingungen und bei niedrigeren Temperaturen zu wachsen.

*Arcobacter* gelten als sehr empfindliche Bakterien, die sehr hohe Anforderungen an ihre Wachstumsbedingungen stellen (HO et al., 2006). In der Regel werden für die



Primärisolierung Selektivnährböden verwendet. Ansonsten wachsen sie auf reichen Nährböden (z.B. Blutagar) und zwar ziemlich langsam (2-4 Tage).

ATABAY et al. (1998) untersuchten die Eignungsfähigkeit von Karmali-Medium, modifiziertem mCCDA-Agar, SSM-Medium (semi – solid blood free selectivity – motility) und CAT-Medium (Cefoperazone, Amphotericin B, Teicoplanin) als Isolationsmethode für *Arcobacter* und *Campylobacter*. Gutes Wachstum zeigten dabei nur zwei *Arcobacter*-Spezies auf Karmali- und SSM-Medien. *A. skirrowii* wuchs schwach auf allen Medien und *A. cryaerophilus* zeigte auf keinem Medium Wachstum.

ATABAY und CORRY (1998) beschrieben die *Arcobacter*-Anreicherungs-Bouillon mit zugesetztem CAT-Supplement, worauf *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* und sogar *A. nitrofigilis* Wachstum zeigten. Diese Bouillon war spezifischer als Preston-Bouillon und die Bolton-Anreicherungsbouillon, welche beide ursprünglich für die *Campylobacter*-Anreicherung entwickelt wurden.

HOUF (2001a) berichtete darüber, dass Medien mit CAT-Supplement und EMJH P80 (Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris –Medium) mit 5-Fluorouracil ausreichend seien um die drei häufigsten *Arcobacter*-Spezies zu isolieren, obwohl einige konkurrierende Mikroorganismen ebenfalls wachsen könnten.

Zur Zeit ist ein modifizierter m-CCDA- Agar (Oxoid) kommerziell erhältlich. Durch die Supplementierung mit CAT kann dieses Medium spezifischer für *A. butzleri* gemacht werden. Der Nährboden unterdrückt das Wachstum von *Campylobacter* spp. durch die Abwesenheit von Eisen-II-Phosphat (FBP), welches zu Abschwächung der Wirkung von Superoxiden und toxischen Sauerstoffverbindungen auf *Campylobacter* eingesetzt wurde.

Die späte Entdeckung von *A. cibarius* als weitere Spezies im Genus *Arcobacter* durch HOUF (2005) verdeutlicht, dass die bisher bekannten *Arcobacter* Spezies diejenigen Vertreter sind, die am leichtesten zu isolieren sind.

CORRY et al. (2003) berichteten über die große Bedeutung der Inkubationszeit. Sie forderten eine Bebrütungsdauer von bis zu sieben Tagen, um *A. skirrowii* und *A. cryaerophilus* nachzuweisen. Des Weiteren könnten noch mehrere bis jetzt unbekannte *Arcobacter* spp. aus der Lebensmittelkette isoliert werden, wie es z.B. ON et al. (2003) mit „*A. skirrowii*-like“ bereits gelungen ist.

*Arcobacter* wachsen am besten nach einem Anreicherungsschritt, da die direkte Isolierung zu einer niedrigeren Nachweisrate führt (VAN DRIESSCHE et al., 2003, 2004). Optimales Wachstum findet unter mikroaeroben Bedingungen (3-5% Sauerstoff) statt, jedoch sind *Arcobacter* auch in der Lage unter aeroben Bedingungen zu wachsen. Das Temperatur-Optimum ist abhängig von der *Arcobacter*-Spezies und den Sauerstoffbedingungen und befindet sich zwischen 25 und 30 °C; die Minimum- Maximumwerte liegen im Bereich von 15 – 37°C.

Die Bebrütungszeit sollte 48 h nicht unterschreiten. HILTON et al. (2001) berichteten über eine optimale Bebrütungsdauer von *A. butzleri* von 58 h bei 30°C.

Das pH - Optimum liegt für *A. butzleri* bei 6,0 – 7, 0 und für *A. cryaerophilus* bei 7, 0 – 7,5. Auch hier gibt es ein Minimum- und Maximumbereich von 5,0 – 8,5 (DS`A und HARRISON, 2005).

Da *Arcobacter* nicht in der Lage sind Kohlenhydrate zu fermentieren oder zu oxidieren, werden sie als chemoorganotroph bezeichnet (HENSYL, 1994).

## 2.4 Identifizierung

### 2.4.1 Biochemische Eigenschaften

*Arcobacter* spp. besitzen im Vergleich zu anderen Bakterien nur eine geringe biochemische Aktivität. Folglich gibt es nur wenige Tests, um den Erreger zu identifizieren. Neben der Kolonie- und Bakterienmorphologie eignen sich vor allem das aerobe Wachstum und die Wachstumstemperaturen zur Bestätigung der *Arcobacter*- Spezies. Weitere Reaktionen zur Identifizierung sind die Oxidase-Reaktion, Katalase-Reaktion, Nitrat-Reduktion, mikroaerophiles Wachstum bei 20°C, Wachstum auf Mac Conkey Agar, Urease-Test und die Hydrolyse von Indoxyl Acetat. Eine ausführliche Übersicht über die biochemischen Eigenschaften von *Arcobacter* sind in der Tabelle 1 auf der nächsten Seite dargestellt (VANDAMME, 2000).

Diese Untersuchungen werden auch als Biotypisierung bezeichnet, weil sie nicht nur die Spezies – Identifizierung ermöglicht, sondern auch eine Unterteilung innerhalb einer Spezies in Biotypen erlaubt (BOLTON et al., 1992).

**Tab. 1:** Biochemische Kriterien zur Identifizierung von *Arcobacter* spp., *Campylobacter* spp. und *Bacillus ureolyticus* (VANDAMME, 2000).

+: 90% der untersuchten Stämme zeigten die Reaktion; -: Reaktion in weniger als 11% der untersuchten Stämme positiv; v: stammabhängige Reaktion; <sup>a</sup>: mindestens 80% der Stämme zeigten diese Reaktion; <sup>b</sup>: inkl. Untergruppe 1 und 2; <sup>c</sup>: inkl. NASC (Nalixidinsäure-empfindliche *Campylobacter*); <sup>d</sup>: inkl. Biovar *sputorum*, *faecalis*, *paraureolyticus*.

Spezies	α-Hämolyse	Katalase	Hippurat-Hydrolyse	Urease	Nitrat-Reduktion	Selenit-Reduktion	H <sub>2</sub> S / TSI (Spuren)	Indoxyl/Acetat-Hydrolyse	Wachstum							Resistenz	
									25°C	42°C	Minimal-Medium	Mac-Conkey	Glycin 1%	NaCl 4%	Cefalotin (64mg/l)	Nalidixin	Cephoperazon
<i>A. butzleri</i>	-	v	-	-	+	-	-	+	+	v	+	v <sup>a</sup>	-	-	+	v	+
<i>A. cryaerophilus</i> <sup>b</sup>	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	v	-	-	+	-	+
<i>A. nitrofigilis</i>	-	+	-	+	+	v	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>A. skirrowii</i>	+	+	-	-	+	v	-	+	+	v	-	-	-	+	+	-	+
<i>B. ureolyticus</i>	v	v	-	+	+	-	-	-	-	v	v	v	+	+	-	-	-
<i>C. coli</i>	v	+	-	-	+	+	v	+	-	+	+	v	+	-	+	-	+
<i>C. concisus</i>	v	-	-	-	v	v	-	-	-	v	-	-	v	-	-	v	-
<i>C. curvus</i>	v	-	v	-	+	-	v	v	-	v	v <sup>a</sup>	v <sup>a</sup>	+	-	v <sup>a</sup>	+	-
<i>C. fetus</i> ssp. <i>Fetus</i>	-	+	-	-	+	v <sup>a</sup>	-	-	+	v <sup>a</sup>	v	v	+	-	+	+	-
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	v	v <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	-	+	-	v <sup>a</sup>	v	-	-	-	v	-
<i>C. gracilis</i>	-	v	-	-	v <sup>a</sup>	-	-	v	-	v	v	v <sup>a</sup>	+	-	-	v	-
<i>C. helveticus</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	v	-	v	-	-
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	v	+	-	-	+	+	+	-	v	+	v	v	+	-	-	+	v
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	v	+	-	+	+	+	+	-	-	+	v	v	v	-	v	+	-
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doyley</i>	+	v	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	+	-	+	v	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. lari</i> <sup>c</sup>	v	+	-	v	+	v	-	-	-	+	-	-	+	-	+	v	+
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	v <sup>a</sup>	v	-	v	v <sup>a</sup>	-
<i>C. rectus</i>	+	v	-	-	+	-	-	+	-	v	-	-	+	-	-	v <sup>a</sup>	-
<i>C. showae</i>	+	+	-	-	+	-	v	v	-	v	v	+	v	-	-	-	-
<i>C. sputorum</i> <sup>d</sup>	+	v	-	v	+	v	+	+	-	+	v	v	+	v	-	v	-
<i>C. upsaliensis</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	v	-	-	+	-	v	-	v

Da es zurzeit keine genormten ISO–Untersuchungsverfahren für *Arcobacter* spp. gibt, sind in den jeweiligen Veröffentlichungen über dieses Bakterium unterschiedliche Reaktionen zum Nachweis von *Arcobacter* durchgeführt worden.

Da *Arcobacter* spp. Cytochromoxidase–positiv sind, eignet sich dieser Test zur sicheren Abgrenzung gegenüber den Gram–negativen *Enterobacteriaceae*. Des Weiteren ist das Bakterium in der Lage, Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser zu spalten. In dieser Katalase – Reaktion entsteht die typische Schaum- oder Bläschenbildung.

## **2.5 Molekularbiologische Differenzierung**

### **PFGE**

Bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) werden Bakterien in ein Gel eingebettet und die chromosomale DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die in Agarose-Blöckchen befindlichen DNA-Fragmente werden in ein Agarose-Gel eingesetzt und mit Hilfe von wechselnden Spannungen aus verschiedenen Richtungen in abgrenzbare Banden getrennt. Mit *Sac II*, *Eag I* und *Sma I* Restriktionsenzymen geschnittene PFGE- Banden können für die Genotypisierung von *Arcobacter* spp. verwendet werden (RIVAS et al., 2004). Dies geschieht durch den Vergleich der übereinstimmenden oder unterschiedlichen Banden. Ziel dieser Typisierung ist es epidemiologische Zusammenhänge zwischen den einzelnen *Arcobacter*-Isolaten herleiten zu können. RIVAS et al. (2004) konnten in ihrer Studie anhand von Fleischproben feststellen, dass EAG I weniger Banden als SMA I und SAC II induziert. Somit besitzt EAG I ein niedrigeres Unterscheidungspotenzial als die anderen Enzyme. STOEVA und WARD (2006) testeten verschiedene Restriktionsenzyme auf ihre Tauglichkeit, *A. butzleri* NCTC 12481 zu schneiden. Als Ergebnis dieser Studie wurden EAG I und XHO I als gute Kandidaten für die Typisierung von *A. butzleri* genannt.

PFGE Profile sind sehr anfällig gegenüber genomischen Veränderungen, wie z.B. Rekombination. Diese Tatsache macht die Auswertung und die Interpretation der PFGE Profile schwierig (HUME et al., 2001).

## **AFLP**

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) wird von ON et al. (2002, 2004) als ein solides, reproduzierbares und schnelles Genotypisierungsverfahren mit hohem diskriminatorischem Potenzial vorgestellt. Bei dieser Methode wird die komplette genomische DNA mit zwei Restriktionsenzymen verdaut und anschließend ein PCR-Produkt hergestellt. Durch die Markierung der verwendeten Primer lassen sich die entstandenen Produkte nach einer Gelelektrophorese als Banden darstellen. Die AFLP ist unempfindlich gegenüber genomischer Rekombination.

SCULLION et al. (2001) verglichen die von HOUF et al. (2000) entwickelte m-PCR mit der AFLP-Methode auf ihre Sensitivität hinsichtlich der Speziesdifferenzierung. Dieser Vergleich ergab eine gute Korrelation zwischen den beiden Methoden, obwohl 3 *A. skirrowii*-Isolate atypische *Arcobacter*-AFLP-Profile aufwiesen, wohingegen die PCR-Methode diese Isolate als *Arcobacter* einordnete.

## **2.6 Tenazität: Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit**

Die Widerstandsfähigkeit von Bakterien und Viren gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen wird als Tenazität bezeichnet und leitet sich vom lateinischen „tenacitas“ ab, d.h. Zähigkeit.

Die optimalen Wachstumstemperaturen der nicht thermophilen *Arcobacter*- Spezies liegen zwischen 15 – 37°C, wobei zwischen 25 – 30°C die spezifische Wachstumsrate am höchsten ist (HILTON et al., 2001). Bei 40°C konnten VANDAMME et al. (1992) und LEHNER (2005) kein Wachstum mehr nachweisen. Die Fähigkeit bei 25°C unter aeroben Bedingungen zu wachsen ist ein entscheidendes Merkmal, welches *Arcobacter* spp. von den thermophilen *Campylobacter* unterscheiden lässt (MANSFIELD und FORSYTHE, 2000; HILTON et al., 2001). HILTON et al. (2001) untersuchten den Effekt der Kühlung (4°C) und des Tiefgefrierens (-20°C) auf *A. butzleri*. Die Lagerung von Zellen in der stationären Phase bei 4°C verursachte eine graduelle Abnahme ( $\log_{10}^4$  KbE/g) über 21 Tage. Das Einfrieren hingegen verursachte eine Abnahme um  $10^2$  KbE/g in der Überlebensfähigkeit nach nur 24 h Lagerung. Danach blieb die Überlebensfähigkeit jedoch konstant.

VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) beobachteten einen signifikanten Unterschied in der Tenazität innerhalb der *Arcobacter*- Spezies bei verschiedenen Temperatureinflüssen sowie

beim Einfluss von organischem Material. *A. butzleri* überlebte signifikant länger im Vergleich zu *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* bei den verschiedenen Versuchstemperaturen, welche zwischen 4°C und 60°C lagen. Des Weiteren konnten die Untersucher feststellen, dass alle Spezies eine längere Überlebenszeit aufwiesen, wenn dem reinen Wasser organisches Material zugefügt wurde.

Im Hinblick auf die Bekämpfung von *Arcobacter* spp. wurden verschiedene Verfahren auf ihre Effektivität hinsichtlich der Elimination dieser Erreger untersucht. HILTON et al. (2001) untersuchten die Thermotoleranz der Organismen in Bouillon-Kultur. Dabei wies *A. butzleri* bei 55°C eine dezimale Reduktionszeit von 0,4 min. für Zellen in der stationären Phase und 1,1 min für Zellen in der Wachstumsphase auf. Diese Daten sind vergleichbar mit den D-Werten von *C. jejuni* (55°C, 0,64 – 2,13 min) (ANONYMOUS, 1996).

HILTON et al. (2001) beobachteten einen D-Wert bei *A. butzleri* von D50: 18,5 min. und D55: 1,1 – 2 min. mit einem Z-Wert von 7,4 bis 8,1°C.

VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) untersuchten neben der Überlebensfähigkeit von *A. butzleri* als erste auch die Tenazität von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* in Wasser. Bei 52°C zeigten *A. butzleri* und *A. skirrowii* eine längere Überlebenszeit als *A. cryaerophilus*. Bei Temperaturen von 56°C und 60°C fielen *A. butzleri*, *A. skirrowii* und *A. cryaerophilus* unter die Nachweisgrenze von 10 KBE/ml nach 18, 6 und 4 min bzw. bei 60°C nach 4, 1 und 0,5 min.

D'SA und HARRISON (2005) beschrieben, dass eine mittlere Hitze von 50°C gefolgt von einem Kälteschock (4°- 8°C) einen synergistischen letalen Effekt auf die Erreger hatte. Bei dem Versuch konnte die Zellzahl durch diese Doppelbehandlung deutlich verringert werden, als durch eine alleinige Hitze- oder Kältebehandlung von 12° - 16°C.

Somit lässt sich feststellen, dass *Arcobacter* spp. durch ein standardisiertes Erhitzungsverfahren, wie z.B. eine Erwärmung auf 70°C sicher abgetötet werden.

Bei 37°C stieg das untere pH-Limit auf 5,5 (HILTON et al., 2001). PHILLIPS und BATES (2004) stellten fest, dass *Arcobacter* spp. kein Wachstum mehr unter einem pH-Wert von 4,0 aufwiesen. Allerdings ist dies abhängig von der angewendeten Säure, den Wachstumsbedingungen und der Wachstumsphase. Die dezimalen Reduktionszeiten bei pH 7,3 lagen für drei *A. butzleri* Stämme bei 0,07 bis 0,12 min. in einer Umgebungstemperatur von 60°C. Bei 55°C stiegen die D-Werte auf 0,38 – 0,76 min und bei 50°C auf 5,12 – 5,81

min. Bei einem pH-Wert Anstieg auf pH 5,5 konnte eine abnehmende Thermotoleranz festgestellt werden mit D-Werten von 0,03 – 0,11 min bei 60°C, 0,30 – 0,42 min bei 55°C und 1,97 – 4,42 min bei 50°C. Die kalkulierten Z-Werte lagen zwischen 5,20 bis 6,28°C (D`SA und HARRISON, 2005).

Die optimale NaCl- Konzentration für *Arcobacter* liegt bei 0,5%. Das sind Konzentrationen, wie sie in den entsprechenden Kultivierungsmedien eingesetzt werden. Die Empfindlichkeit gegenüber höheren Salzkonzentrationen ist abhängig von der Temperatur und dem Medium, in dem sich die Bakterien befinden. D`SA und HARRISON (2005) beschrieben das optimale 24 h – Wachstum in Anwesenheit von 0,5 – 1% NaCl für *A. cryaerophilus*. Nach 96 h lag das Optimum bei 0,5 – 2% NaCl. *A. butzleri*- Stämme wuchsen am besten bei einer NaCl-Konzentration von 0,09 – 0,5% nach 96 h.

Das obere Wachstumslimit wird mit 3% NaCl für *A. butzleri* und 3,5% NaCl für *A. cryaerophilus* angegeben. Jedoch wiesen D`SA und HARRISON (2005) ein Wachstum von einigen *A. butzleri* Stämmen bei 25°C und 5% NaCl nach.

Auf Austrocknung reagieren *Arcobacter* spp. besonders sensibel. Bei Untersuchungen durch OTTH et al. (2001) reagierten 11 *A. butzleri*- Stämme sehr unterschiedlich auf die Austrocknung. Die weniger resistenten Stämme überlebten keine zwei Stunden, wohingegen bei zwei weiteren Stämmen nach mehr als 48 Stunden noch ein Wachstum nachgewiesen werden konnte. Dies bekräftigt die Aussage von HAZELEGER et al. (2003), dass *A. butzleri* in der Lage ist, auf Stahloberflächen länger als vier Tage zu überleben. OTTH et al. (2001) kamen zu dem Ergebnis, dass *A. butzleri* anscheinend resistenter gegenüber Austrocknung zu sein scheint, als *Campylobacter* spp., dessen Austrocknungsresistenz zwischen zwei und zehn Stunden liegt (FERNÁNDEZ et al., 1995).

Obwohl *A. butzleri* eng mit *C. jejuni* verwandt ist (VANDAMME et al., 1991) reagiert *A. butzleri* nicht zwangsläufig identisch wie *C. jejuni* auf die verschiedensten Bekämpfungsstrategien. Hinsichtlich der Bestrahlung verhält sich *A. butzleri* resistenter als *C. jejuni* mit einem durchschnittlichen D<sub>10</sub>-Wert von 0,27 kGy verglichen mit 0,19 kGy von *C. jejuni* (COLLINS et al., 1996).

### 2.6.1 Organische Säuren

Eine weitere Kontrollmaßnahme im Umgang mit *Arcobacter* stellt der Einsatz von organischen Säuren dar. PHILLIPS (1999) untersuchte den hemmenden Effekt verschiedener Säuren auf *A. butzleri*. Bei 0,5%, 1% und 2% Milchsäure und Zitronensäure konnte ein hemmender Effekt auf das Wachstum von *A. butzleri* nachgewiesen werden. 2% Natriumlaktat konnte das Wachstum für 8 Stunden hemmen, jedoch nicht über einen längeren Zeitraum.

CERVENKA et al. (2004) beschrieben den Einsatz von organischen Säuren (> 0,2% Essigsäure und Zitronensäure) als ein probates Mittel im Dekontaminationsprozess von Fleischprodukten, um *A. butzleri* nachhaltig zu reduzieren. Sie untersuchten unter Berücksichtigung der Wasseraktivität ( $a_w$ -Wert) bei  $a_w = 0,993$  und bei  $a_w = 0,977$  den hemmenden Effekt der organischen Säuren und konnten nach 4-5 stündiger Inkubationszeit keine kultivierbaren Zellen mehr nachweisen.

PHILLIPS und DUGGAN (2002) untersuchten den Effekt von Temperatur und Zitronensäure allein und in Anwesenheit von Nisin auf das Wachstumsverhalten von *A. butzleri* in Kultur.

Nisin ist ein antimikrobielles Peptid, welches von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produziert wird und hauptsächlich gegen Gram-positive Bakterien wirkt (DELVES-BROUGHTON, 1990). *Arcobacter* spp., als Gram-negative Bakterien, können ebenfalls sensitiv auf Nisin reagieren, wenn die Bakterienhülle mit einem Agens vorbehandelt wird, welches die Zellmembran zerstört, wie z.B. Trisodiumphosphat (DE MELO et al., 1998), oder mit einem chelatbildendem Agens wie z.B. EDTA penetriert wird (DELVES-BROUGHTON, 1993). Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit von 30°C konnten PHILLIPS und DUGGAN (2002) eine 12,2%-ige Überlebensrate der Zellen, welche in Abwesenheit von Nisin einer Temperatur von 50°C ausgesetzt wurden, nachweisen. Wurde der Kultur jedoch zusätzlich Nisin zugesetzt konnten lediglich 0,1 % der Zellen überleben.

Des Weiteren sind Trisodiumphosphat und EDTA allein oder in Kombination mit Nisin in der Lage, die Überlebensrate von *A. butzleri*- Zellkulturen effektiv zu reduzieren (PHILLIPS und DUGGAN, 2002).



## 2.7 Epidemiologie

Die Anzahl von Ausbrüchen und Einzelerkrankungen bei Menschen, welche auf eine *Arcobacter*-Infektion zurückzuführen sind, ist unbekannt, da dieser Erreger nicht bei einer routinemäßigen klinischen Untersuchung erfasst wird. Trotz der Tatsache, dass spezifische Isolations- Verfahren nur selten in Routine-Untersuchungen durchgeführt werden, konnte über einen Ausbruch von Gastroenteritis berichtet werden (VANDAMME et al., 1993).

Des Weiteren mehren sich die Hinweise, dass *Arcobacter* spp. eine grundlegende Rolle im Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen spielen (VANDAMME et al., 1993; PHILLIPS, 2001). Obwohl *Arcobacter* spp. zur Zeit keine hohe Gesundheitsgefährdung für die Bevölkerung darstellen, könnten unentdeckte *Arcobacter*-Infektionen in Form von Bakteriämien für immunsupprimierte Menschen lebensbedrohlich werden (SNELLING et al., 2006). Aus diesem Grund sollten die Übertragungswege für diese Infektionen näher untersucht werden. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei die Aufnahme des Erregers über kontaminierte Lebensmittel.

### 2.7.1 Natürliche Reservoirs

Der Erreger wird in einer Vielzahl von Quellen gefunden. Dabei handelt es sich in erster Linie um den Verdauungstrakt warmblütiger Säugetiere, wohingegen der Magen-Darm-Trakt von Vögeln nicht als natürliches Habitat für *Arcobacter* spp. gilt. Dies lässt sich auf die hohe Körpertemperatur (41°C) dieser Tiere zurückführen. Weiterhin wird dieses Bakterium auch bei klinisch gesunden Tieren isoliert, welche somit als latente Träger des Erregers in Betracht kommen.

#### 2.7.1.1 Umwelt

Das Vorkommen von *Arcobacter* spp. in der Umwelt ist insbesondere in Gewässern nachzuweisen. Es wurde darauf hingewiesen, dass Wasser evtl. eine wichtige Rolle bei der Verbreitung von *Arcobacter* spp. spielt (ANDERSON et al., 1993; LERNER et al., 1994). Wasser wurde als Hauptinfektionsquelle einer Durchfallerkrankung im Zusammenhang mit diesen Organismen angesehen (KIEHLBAUCH et al., 1991).

Frühere Annahmen, dass *Arcobacter* öfter in Ländern mit einer inadäquaten Wasserversorgung vorkommen (RICE et al., 1999), haben sich nicht bestätigt, da sowohl in Asien auch als in den USA und Europa *Arcobacter* spp. in ähnlichem Umfang nachgewiesen wurden.

Während einer Untersuchung in einer Trinkwasseraufbereitungsanlage in Deutschland wurden 141 *Arcobacter*- Stämme und nur sechs *C. jejuni* und *C. coli* isoliert (JACOB et al., 1993). Dieses Ergebnis könnte mit den unterschiedlich ausfallenden optimalen Wachstumstemperaturen zusammen hängen.

Die Prävalenz von *Arcobacter* spp. von Umweltwasserproben in Japan und Thailand zeigten 23 % in japanischen Flusswasserproben und 100 % in thailändischen Kanalproben (MORITA et al., 2004).

Die Ausbringung von Klärschlamm aus den Abwasseraufarbeitungsanlagen als Dünger auf die Felder wird von ARIMI et al. (1988) als ein möglicher Transmissionsweg von *Campylobacter* zurück in die menschliche Nahrungskette angesehen. *Arcobacter* spp. wurden ebenfalls in Abwasser- und Klärschlamm-Proben mit Nachweisraten von 41% bis 80% isoliert (STAMPI et al., 1999). Als Teil fäkaler Kontaminationen können *Arcobacter* spp. sich leicht in andere Wasser-Ressourcen verbreiten (DONACHIE et al., 2005). Dies wiederum könnte bei Aufnahme des kontaminierten Wassers zu einer Kolonisierung in Tieren oder zu menschlichen Erkrankungen führen.

MORENO et al. (2003) wiesen *Arcobacter* spp. in Oberflächen- und Flusswasser nach, während RICE et al. (1999) das Grundwasser als ein weiteres Habitat von *Arcobacter* entdeckten. Durch die Fähigkeit dieses Bakteriums, sich im Biofilm an den Oberflächen von Wasserleitungen (Stahl, Kupfer, Plastik) festzusetzen, besteht die Möglichkeit der Rekontamination des Wassers in den Versorgungsleitungen (ASSANTA et al., 2002). Dies könnte ein signifikantes Problem für die öffentliche Gesundheit im Hinblick auf die Trinkwasserversorgung und die lebensmittelverarbeitenden Betriebe darstellen.

### **2.7.1.2 Säugetiere**

In der Tierwelt sind *Arcobacter* spp. vor allem im Verdauungstrakt von gesunden Tieren, welche keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung zeigen, zu finden (HUME et al., 2001). In Kotproben von gesunden Rindern (KABEYA et al., 2003b; ONGOR et al., 2004; VAN

DRIESSCHE et al., 2005), Schweinen (HUME et al., 2001; KABEYA et al., 2003b; VAN DRIESSCHE et al., 2004) Geflügel (KABEYA et al., 2003b), Schafen und Pferden (VAN DRIESSCHE et al., 2003) konnten *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden.

Die Prävalenz von *Arcobacter* Spezies in den jeweiligen Tierarten variiert von Land zu Land. Generell trifft die Aussage zu, dass *Arcobacter* spp. in Schweinen öfter isoliert werden als in Rindern.

KABEYA et al. (2003b) beprobten über ein Jahr ein Schlachthaus in Japan und konnten bei 3,6% der Rinder- und bei 10% der Schweine – Kotproben *Arcobacter* spp. isolieren. Die gleiche Studie in Belgien ermittelte eine Belastung von 39 und 44% (VAN DRIESSCHE et al., 2003). In einer anderen Studie wiesen VAN DRIESSCHE et al. (2004) eine hohe Belastung von *Arcobacter* spp. in belgischen Sauenbeständen nach. Eine hohe Anzahl von tragenden Sauen (59%), bzw. Sauen nach dem Abfekeln (85%), waren positiv für *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Die Prävalenz von *Arcobacter* Spezies bei Sauen in den USA lag zwischen 7,2 und 36,4% (HUME et al., 2001). HO et al. (2006) testeten 42% der Sauen in einem holländischen Betrieb positiv auf mehr als eine *Arcobacter* Spezies.

OHLENDORF und MURANO (2002) und VILLARRUEL-LOPEZ et al. (2003) berichteten über *Arcobacter*- belastetes Schweinefleisch, welches als Quelle einer *Arcobacter*-Infektion ermittelt werden konnte. Des Weiteren wird dieser Erreger weltweit mit Unfruchtbarkeit der Sauen und Aborten in Verbindung gebracht (DE OLIVEIRA et al., 1997). In mehreren Fällen von Aborten in einem dänischen Sauenbestand konnten keine für dieses Geschehen typischen Erreger nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen brachten eine hohe Belastung mit *Arcobacter* spp. zum Vorschein (ON et al., 2002). Der Autor kam zu dem Schluss, dass einige *Arcobacter*-Stämme eine primäre Rolle beim Abortgeschehen haben, während andere Stämme den Fötus möglicherweise sekundär als opportunistischer Erreger besiedeln.

Trotz der Tatsache, dass *Arcobacter* spp. in neugeborenen Ferkeln und in ihren plazentaren Anteilen präsent sind (ELLIS et al., 1978) und ihrer Fähigkeit einen Tag alte Ferkel im Versuch zu kolonialisieren (WESLEY et al., 1996), wurde bis jetzt noch über keinen Fall berichtet, bei dem die Milch einer *Arcobacter*- positiven Sau als Ursache für eine Erregerübertragung auf die Saugferkel gilt. KABEYA et al. (2003) untersuchten in Japan das Vorkommen von *Arcobacter* in Kotproben verschiedener Tierarten. Die durchschnittliche Prävalenz von *Arcobacter* in Schweineproben lag bei 10%, die Belastung der Rinderproben

lag bei 3,6%. Bei den Untersuchungen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich eines jahreszeitlichen Einflusses festgestellt werden. Die positiven Rinderproben variierten zwischen 1,4% im Frühling und 7,6% im Sommer. Der höchste Nachweis in den Schweineproben gelang im Herbst mit 17,9%.

VAN DRIESSCHE et al. (2004) untersuchten Schweinekotproben in belgischen Beständen auf das Vorhandensein von *Arcobacter*. Die Prävalenz variierte zwischen 16 und 85%. Dabei wurde eine quantitative Kontamination der Tiere mit bis zu  $10^4$  KbE/g Kot festgestellt. 2003 wiesen VAN DRIESSCHE et al. in 44% der Schweine-, in 40% der Rinder-, in 16% der Schaf- und in 15% der Pferdekotproben *Arcobacter* nach. Dabei konnten alle drei bei Tieren nachgewiesenen *Arcobacter* spp. mit einer Belastung von bis zu  $10^3$  KbE/g Kot isoliert werden.

Generell trifft die Aussage zu, dass *A. butzleri* die am häufigsten in gesunden Tierbeständen isolierte *Arcobacter*- Spezies ist (WESLEY et al., 2000; VAN DRIESSCHE et al., 2003; ONGOR et al., 2004). Trotzdem konnte *A. cryaerophilus* als dominante Spezies in Rinderkotproben isoliert werden, gefolgt von *A. skirrowii*, wie eine Studie von VAN DRIESSCHE et al. (2005) zeigt. HO et al. (2006) berichteten über *A. skirrowii* als am häufigsten nachgewiesenen Erreger in Sauenkotproben in einem holländischen Bestand. Ein Vergleich dieser Daten ist aufgrund der unterschiedlichen Nachweistechiken schwierig, da verschiedene Verfahren die Isolation der jeweiligen *Arcobacter*- Spezies begünstigen (VAN DRIESSCHE et al., 2005). In der gleichen Studie konnten die Verfasser eine große Heterogenität der Isolate feststellen. Zusätzlich waren in vielen Fällen die Tiere mit mehr als einem Genotyp kontaminiert (VAN DRIESSCHE et al., 2005).

Neben den bekannten Reservoiren für *Arcobacter* mit epidemiologischem Zusammenhang zu Erkrankungen des Menschen gibt es nur wenige Berichte über das Vorkommen bei Hund und Katze. HOUF et al. (2008) untersuchten die potenzielle Gefahr einer *Arcobacter*-Infektion durch Haustiere. Dabei untersuchten sie Kotproben und Oraltupfer von 267 Hunden und 61 Katzen. Alle Katzenproben waren negativ für *Arcobacter* spp. Bei fünf Hunden konnte *Arcobacter* im Kot nachgewiesen werden, zwei weitere Hunde trugen den Erreger im Maul. Somit belegten die Autoren, dass der Kontakt mit Hunden eine weitere potenzielle Quelle einer *Arcobacter*- Infektion für den Menschen sein kann (HOUF et al., 2008).

### 2.7.2 *Arcobacter*-Infektion des Menschen

VANDENBERG et al. (2004) und PROUZET – MAULÈON et al. (2006) stellten fest, dass *A. butzleri* neben *C. jejuni*, *C. coli* und *C. fetus* der am vierthäufigsten aus menschlichen Stuhlproben isolierte Erreger aus der Fam. *Campylobacteriaceae* ist.

*A. butzleri* war der einzige potenzielle pathogene Darmerreger, welcher während eines Ausbruchs in einem italienischen Kindergarten und einer Grundschule, in denen 10 infizierte Kinder an wiederkehrenden abdominalen Krämpfen ohne Durchfall litten, isoliert werden konnte (VANDAMME et al., 1992). Das Bakterium wurde auch bei thailändischen Kindern nachgewiesen, welche an Durchfall erkrankt waren (TAYLOR et al., 1991). TEE et al. (1988) berichteten über einen mit *A. cryaerophilus* infizierten Australier, der an intermittierendem Durchfall und abdominalen Krämpfen litt. 2004 konnte das erste Mal *A. skirrowii* bei einer älteren Person mit chronischem Durchfall isoliert werden (WYBO et al., 2004). Die Rolle von *A. skirrowii* als Ursache menschlicher Erkrankungen ist noch nicht ganz geklärt, jedoch stufen die Autoren das Gesundheitsrisiko durch diese Spezies als gering ein.

*Arcobacter* spp. verursachen neben Enteritiden auch Bakteriämien. In drei weiteren Fällen waren ältere Personen betroffen. Zwei von Ihnen wiesen ein chronisches Erkrankungsbild auf (HSUEH et al., 1997; YAN et al., 2000; LAU et al., 2002). Die Übertragung der Erreger ereignete sich im ersten Fall über eine infizierte arteriovenöse Fistel (HSUEH et al., 1997), auf oralem Weg beim nächsten Fall (LAU et al., 2002) und auf unbekannte Weise beim dritten Patienten (YAN et al., 2000).

ON et al. (1995) gingen von einer vertikalen / transplazentaren Übertragung in einem Fall aus, bei dem ein Neugeborener an einer durch *A. butzleri* verursachten Bakteriämie erkrankte, obwohl die Mutter vor der Entbindung keine Anzeichen einer Infektion zeigte.

*A. cryaerophilus* wurde im Blut eines Jungen festgestellt, der in einen Schlammteich gefallen war und anschließend an einer akuten respiratorischen Symptomatik, disseminierter intravasaler Gerinnung und akutem Nierenversagen verstarb. Als Quelle der Erkrankung wird die Aufnahme der Erreger aus dem Schlammteich über das Respirationssystem angesehen (WOO et al., 2001).

Ausser dem letzten Fall einer Bakteriämie (WOO et al., 2001), wurden *Arcobacter*-Infektionen in den meisten Fällen bei Patienten mit chronischen Krankheiten nachgewiesen. Dies betraf ältere Personen und Kinder. VANDENBERG et al. (2004) berichteten darüber,

dass das Alter der Patienten, die durch *A. butzleri* an Durchfall litten, zwischen 30 und 90 Jahren lag. Von den infizierten Patienten waren 16% immunsupprimiert oder waren an einer anderen chronischen Krankheit erkrankt (VANDENBERG et al., 2004). Das Durchfallgeschehen, welches durch *A. butzleri* verursacht wird, scheint beharrlicher, wässriger und asymptomatischer zu sein, aber weniger akut als durch *C. jejuni* verursachte Durchfälle (VANDENBERG et al., 2004).

Zusammenfassend wurden bisher weltweit nur sporadische *Arcobacter*- Infektionen bestätigt. In der Stellungnahme 046/2007 durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) im November 2007 kommen die Autoren zu der Erkenntnis, dass derzeit noch Daten zur Exposition sowie zu den potenziellen Auswirkungen des Erregers fehlen. Ebenfalls scheint eine Schätzung der Exposition derzeit aufgrund unzureichender Angaben zu Indizien (mittels Einzelfallmeldungen und anderer errechneter oder geschätzter Informationen) nicht möglich (BfR Nr. 046/2007).

### 2.7.2.1 Pathogenität und Virulenzfaktoren

Seit der Beschreibung des Genus und vielen veröffentlichten Berichten über die Präsenz von *Arcobacter* spp. in Lebensmitteln und den Zusammenhang mit menschlichen und tierischen Erkrankungen, ist noch sehr wenig über dessen Pathogenitätsmechanismen bekannt.

In einem Ileum–Schleifen–Model konnte bei Ratten ein Ansteigen der Elektrolytkonzentration verursacht durch zwei *A. cryaerophilus* – Isolate, welche von einem abortiertem Rinder– Fetus und aus Schweine– Fäzes gewonnen wurden, nachgewiesen werden (FERNANDEZ et al., 1995). In Versuchen mit CHO, HELA und INT 407 Zell– Linien, an denen mittels degenerierten PCR– Primern, welche für Zytotoxine (CDT) von *E. coli* und *C. jejuni* kodieren, konnten keine CDT – Aktivität und CDT – Gene in Isolaten von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* aus Umwelt-, humanen und tierischen Proben nachgewiesen werden (MUSMANNO et al., 1997 und JOHNSON und MURANO, 2002). Die invitro Zytotoxizität von *Arcobacter* spp. äusserte sich in Zellmorphologie– Veränderungen (Verlängerung, Vakuolisierung, Kernpyknose) (MUSMANNO et al., 1997; JOHNSON und MURANO, 2002; FERA et al., 2003; VILLARUEL-LOPEZ et al., 2003). Das toxische Molekül soll < 10 kDa groß sein (JOHNSON und MURANO, 2002).

TSANG et al. (1996) entdeckten die Hämagglutinationsaktivität zweier *Arcobacter* Stämme an menschlichen und tierischen Erythrozyten. Das Hämagglutinin wurde als Lektin-ähnliches Protein mit einer Größe von ca. 20 kDa, welches mit einem D-Galaktose enthaltenen Rezeptor an der Zelloberfläche der Erythrozyten reagiert, charakterisiert. Ein möglicher Grund für das beschränkte Wissen über die Pathogenität von *Arcobacter* spp. sehen HO et al. (2006) in genomischen Unterschieden zu *Campylobacter* spp. Die Versuche, welche hinsichtlich der Pathogenitätsmechanismen von *Arcobacter* spp. gemacht wurden, basierten vor allem auf dem Wissen über die Mechanismen von *Campylobacter* spp. und anderen gastrointestinalen pathogenen Keimen wie z.B. *Helicobacter*. MILLER et al. (2005) bewiesen, dass das Genom von *A. butzleri* RM4018 dem Genom von *Wollinella succinogenes* wesentlich ähnlicher ist als das von *Campylobacter* spp. Somit sollten die Studien zu Pathogenitätsfaktoren neu überdacht werden.

In einer Feldstudie wurden 3- und 5-Tage alte Hühner- und Puten- Küken mit einem humanen *A. butzleri*- Stamm und mit Hühner- und Puten- Feldisolaten oral infiziert (WESLEY und BAETZ, 1999). Der humane Stamm konnte die White Leghorn Hühner und die kommerziell ausgebrüteten Puten nicht kolonisieren, wurde aber in Kloaken- Tupfern und Gewebe- Proben der hochgezüchteten Beltsville White Puten nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Invasionskapazität und die Virulenz von *A. butzleri*- Stämmen wirtsabhängig von der Spezies und der Rasse war.

### **2.7.2.2 Erkrankung und Therapie**

Über *Arcobacter*- Infektionen des Menschen wurde in den letzten Jahren vermehrt in der Fachliteratur berichtet. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass das Vorkommen von *Arcobacter* verursachten Erkrankungen aufgrund der fehlenden routinemäßigen Diagnostik und der unterschiedlichen Nachweisverfahren unterschätzt wird.

Die Symptome einer *Arcobacter*- Infektion reichen von einem asymptomatischen bis zu einem septikämischen Erscheinungsbild. Am häufigsten treten jedoch Symptome einer akuten wässrigen Diarrhoe auf, die drei bis 15 Tage lang anhalten können (KIEHLBAUCH et al., 1991; LEHNER et al., 2005; LERNER et al., 1994). Des Weiteren können die Symptome auch persistieren oder in einem Abstand von zwei Wochen bis zwei Monate rekurren (WYBO et al., 2004). In der Regel treten zusätzliche abdominale Schmerzen und Übelkeit

auf. Bei einigen Patienten zeigten sich auch Schwächeanfälle, Fieber, Schüttelfrost und Erbrechen (VANDENBERG et al., 2004). Neben diesen klinischen Erscheinungen wurde *Arcobacter* auch mit rekurrierenden Krämpfen, Bakteriämie, Endokarditis, Peritonitis und Apendicitis in Verbindung gebracht (HSUEH et al., 1997; ON et al., 1995a; YAN et al., 2000). Vermutlich spielen zelltoxische chemische Stoffe, welche aber noch nicht weiter charakterisiert wurden, eine große Rolle als Verursacher dieser Erscheinungen. Die Inkubationszeit und die Infektionsdosis sind bis heute nicht ganz geklärt. *Arcobacter* kann bei allen Altersstufen vorkommen, jedoch ist die Prävalenz bei Kindern am höchsten.

In der Regel hält die Symptomatik eine Woche an. Eine *Arcobacter*- Infektion ist nach dem klinischen Erscheinungsbild nicht von einer Infektion durch andere Erreger wie *Campylobacter*, *Salmonellen* oder *Yersinien* zu unterscheiden.

Bei einer Infektion mit *Arcobacter* spp. ist als symptomatische Behandlung die Flüssigkeitszufuhr von entscheidender Bedeutung, welche das durch den andauernden Durchfall zustande kommende Flüssigkeitsdefizit ausgleicht, das entscheidende Kriterium. Ein Antibiotika- Einsatz spielt nur eine untergeordnete Rolle, zumal ein Einsatz dieser Medikamente ohne vorherige Erregerisolierung und einem aussagekräftigem Resistenztests die Entwicklung von Resistenzen fördert (SKIRROW und BUTZLER, 2000). Der Einsatz von Antibiotika sollte sich daher nur auf schwere klinische Fälle, eine Bakteriämie und bei hohem Fieber beschränken. Des Weiteren sollten gefährdete Personen, wie z.B. Kinder, Schwangere und immunsupprimierte Menschen, mit Antibiotika behandelt werden. Als Mittel der Wahl gelten Aminoglycoside, inklusive Kanamycin und Streptomycin (KABEYA et al., 2004; THWAITES und FROST, 1999).

### **2.7.2.2.1 Antibiotikaresistenzen**

Bis jetzt haben verschiedene Antibiotika- Versuchsstudien gezeigt, dass *Arcobacter* empfindlich gegenüber Aminoglycosiden, inklusive Kanamycin und Streptomycin ist. THWAITES und FROST (1999) und KABEYA et al. (2004) wiesen die gleichen Empfindlichkeiten gegenüber diesen Antibiotika bei *Campylobacter* nach. Gegen Erythromycin und Ciprofloxacin entwickelten viele aus Geflügel isolierte Stämme eine Resistenz. Dies stellt zurzeit ein großes Problem dar, da diese beiden Antibiotika die Mittel der Wahl bei der *Campylobacteriose* des Menschen darstellen (HOUF et al., 2004).



KABEYA et al. (2004) befürworteten den Einsatz von Aminoglycosiden und Tetrazyklinen bei einer durch *Arcobacter* verursachten Erkrankung, allerdings nur unter der Prämisse einer adäquaten Kontrolle des Einsatzes dieser Präparate in der Human- sowie in der Tiermedizin. In ihren Untersuchungen in Japan konnten KABEYA et al. (2004) hohe Resistenzraten von *Arcobacter* spp. gegenüber Vancomycin (100%), Meticillin (97,5%) und Cephalotin (81,1%) nachweisen. Chloramphenicol konnte bei 24,6% der Isolate keine Wachstumshemmung herbeiführen. Jedoch waren alle der 122 untersuchten *Arcobacter*- Stämme empfindlich gegenüber Ampicillin, Tetracyclin, Streptomycin, Kanamycin und Erythromycin. In 73 der 122 Isolate konnte bei *A. butzleri* eine Multiresistenz gegen mindestens vier Antibiotika festgestellt werden. Somit war *A. butzleri* häufiger multiresistent (72,9%) als *A. cryaerophilus* (9,1%) und *A. skirrowii* (13,3%).

HOUF et al. (2001) berichteten darüber, dass alle Isolate resistent gegenüber Vancomycin und Trimethoprim sind. ATABAY und AYDIN (2001) untersuchten die Empfindlichkeit von *A. butzleri* Strängen gegenüber 23 antibiotisch wirksamen Substanzen und stellten fest, dass alle Stämme in Gegenwart von Cephalotin keine Wachstumshemmung aufwiesen.

## **2.8 *Arcobacter*: Vorkommen im Wirtschaftsgeflügel**

Obwohl *Arcobacter* spp. regelmäßig in Geflügelfleisch isoliert werden, ist die Nachweisrate dieses Erregers im Intestinaltrakt dieser Vögel deutlich geringer. ATABAY und CORRY (1997) untersuchten Muskelmagen, Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm von Hähnchen, auf deren Karkassen *Arcobacter* spp. nachgewiesen wurden, konnten aber lediglich ein Isolat anzüchten. Ähnliche Ergebnisse lieferten andere Studien. In Kloaken- Tupferproben von 8 Wochen alten Hähnchen konnten lediglich 1% der Tiere als *Arcobacter* positiv getestet werden. 32% der selben Gruppe waren positiv für *Campylobacter* (WESLEY und BAETZ, 1999). HOUF et al. (2002) konnten trotz der hohen Prävalenzen auf den Karkassen keine *Arcobacter* spp. im Intestinaltrakt von geschlachteten Hähnchen isolieren.

WESLEY und BAETZ (1999) infizierten drei und fünf Tage alte Hähnchen und Puten mit verschiedenen *A. butzleri* und *C. jejuni* Stämmen. Bei den Hähnchen konnte weder in den Kloakentupferproben noch in den Gewebeproben *A. butzleri* wiedergefunden werden. 2,9% der Kloakentupferproben und 6% der Gewebeproben der Puten waren positiv für *A. butzleri*.

*C. jejuni* konnte in allen Kloakentupferproben von Puten und Hähnchen nachgewiesen werden.

EIFERT et al. (2003) infizierten einen Tag alte Hähnchen mit verschiedenen hohen bakteriellen Dosen. Tiere, denen  $10^6$  oder  $10^9$  KbE verabreicht wurden, schieden *A. butzleri* wieder aus. Bei einer Infektionsdosis von  $10^3$  KbE je Tier konnten keine *A. butzleri* im Kot nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass der Gastrointestinaltrakt von Geflügel aufgrund ihrer hohen Körpertemperatur (41°C) nicht das bevorzugte Habitat der nicht-thermophilen *Arcobacter* spp. ist (HO et al., 2006). Ähnliche Untersuchungsergebnisse beobachteten HARRASS et al. (1998). HOUF et al. (2002) konnten im Intestinaltrakt von 30 Broilern keine *Arcobacter* nachweisen, obwohl der Erreger in den Transportkäfigen vor und nach dem Waschen isoliert werden konnte. Im Gegensatz zu diesen Studien konnten ATABAY et al. (2006) in 4,3% der untersuchten Intestinalproben *Arcobacter* spp. bei Broilern feststellen.

In der gleichen Studie wurden 16 Entenherden auf das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. untersucht. Insgesamt konnte dabei eine Erregerbelastung in 75% der Bestände festgestellt werden. In einer Herde konnten bei 7 von 10 Einzeltieren *Arcobacter* in Kloakentupfern isoliert werden, die dazugehörigen Blinddarmproben waren alle negativ. Im Gegensatz zu den Hähnchen- Karkassen war *A. cryaerophilus* der dominante Keim in den Entenproben, gefolgt von *A. skirrowii*. Folglich kamen die Autoren zu der Aussage, dass *Arcobacter* spp. möglicherweise als ein Kommensale von Enten angesehen werden könnte (ATABAY et al., 2006).

2008 untersuchten ATABAY et al. 90 Kloakentupfer von klinisch gesunden Gänsen in der Türkei. 18% der Proben waren mit *Arcobacter* spp. belastet, wobei *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* mit je 44% und *A. butzleri* mit 12,5% vertreten waren. Somit konnten die Autoren nachweisen, dass domestizierte Gänse Träger von verschiedenen *Arcobacter* Spezies sein können. Die Rolle von Gänsen als Reservoir müsse aber noch näher untersucht werden (ATABAY et al., 2008).

Über einen saisonalen Einfluss der *Arcobacter*- Belastung bei Tieren gibt es unterschiedliche Hinweise. VAN DRIESSCHE et al. (2004) berichteten über eine höhere Prävalenz im Frühling und im Sommer als im Winter. In Japan wurde von KABEYA et al. (2003b) kein statistischer Unterschied zwischen der Sommer- und Winterbelastung mit *Arcobacter* festgestellt.

### **2.8.1 *Arcobacter* in der Putenmast**

ANDERSEN et al. (2007) untersuchten in den USA sechs Putenherden auf das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. im Gastrointestinaltrakt. Dabei konnten sie eine Prävalenz von 2% positiven Kloakentupferproben und 2,1% positiven Blinddarmproben feststellen. Sie schlussfolgerten, dass *Arcobacter* nur unregelmäßig den Intestinaltrakt von Puten kolonisieren (ANDERSEN et al., 2007).

ATABAY et al. (2006) berichteten zum ersten Mal über eine Isolation von *Arcobacter* spp. aus dem Verdauungstrakt von natürlich kolonisierten Puten. In 4 von 37 Putenherden (11%) konnten in Kloakentupfern *A. butzleri* oder *A. cryaerophilus* nachgewiesen werden.

ANDERSEN et al. (2007) begründeten die unterschiedlichen Ergebnisse bei Geflügel mit der Tierart (Broiler, Legehennen, Puten), dem Alter der beprobten Tiere, der Menge der nachweisbaren *Arcobacter* spp. in den Kloaken und mit der Sensitivität der verschiedenen Isolationsverfahren oder den unterschiedlichen PCR-Protokolle. HO et al. (online, chapter 4) machen die Nachweisrate von *Arcobacter* in lebenden Tieren abhängig von der Probengröße und der Probenentnahmestelle innerhalb des Verdauungstraktes.

In einer anderen Studie infizierten WESLEY und BAETZ (1999) 3- und 5-Tage alte Broiler und Puten mit verschiedenen *A. butzleri* und *C. jejuni* Strängen. Bei den Broilern konnten in den Kloakentupfern und Gewebeproben keine *Arcobacter* festgestellt werden. Lediglich bei den Puten wurden in 2,9% der Kloakenproben und in 6% der Gewebeproben *A. butzleri* nachgewiesen.

### **2.8.2 Transport, Schlachtung, Verarbeitung**

#### **2.8.2.1 Vorfang und Transport**

Die konventionelle Putenmast in Deutschland ist nach Geschlechtern getrennt. Die Hennen werden in der Regel nach 16 Wochen mit einem Lebendgewicht von 7 – 10 kg geschlachtet, während die männlichen Tiere nach 22 Wochen mit einem Lebendgewicht von bis zu 20 kg vermarktet werden (ZDG, 2005). Allerdings gibt es auch Abweichungen von dieser Langmast. Zum Teil bestimmt die Nachfrage des Verbrauchers die Mastdauer der Puten.

Nach Beendigung der 16 Wochen werden alle weiblichen Tiere durch Fangkolonnen in Transportkisten verbracht und auf LKW verladen. Obwohl Puten im Gegensatz zu Broilern in den meisten Fällen in den sogenannten Offenställen, bei denen eine hohe Frischluftzufuhr gewährleistet werden kann, gehalten werden, stellt das Betreten der Stallungen durch betriebsfremdes Personal eine mögliche Kontaminationsquelle mit *Arcobacter* für die verbleibenden Hähne und für die nachfolgenden Mastdurchgänge dar. GUDE et al. (2005) konnten im Klärschlamm und in stehenden Gewässern ausserhalb der Aufzuchtställe *A. butzleri* nachweisen. Durch das andauernde Rein- und Rausgehen der Kolonnenmitglieder könnten *Arcobacter* spp. über das Schuhwerk in die Stallungen getragen werden. VAN DRIESSCHE et al. (2004, 2005) konnten *Arcobacter* in der näheren Umgebung von Rinder- und Schweinebeständen feststellen. Verschiedene *Arcobacter* Stämme wurden von den Stiefeln des Landwirts und vom Wasseranschluss isoliert.

Ein weiterer Übertragungsweg stellt der Transport der Tiere zum Schlachthof dar. Durch den engen Kontakt der Tiere in den Transportkisten könnten *Arcobacter* über das Federkleid von einem Tier zum nächsten übertragen werden und somit in den Schlachthof gelangen. Diese Kreuzkontamination könnte ihren Ursprung aber auch in den Transportkisten selbst haben, welche bereits vor dem Einfangen der Tiere mit *Arcobacter* belastet sein können. HOUF et al. (2002) isolierten diesen Erreger aus Transportkisten von Beständen, von denen keine *Arcobacter* spp. im Blinddarminhalt nachgewiesen werden konnten.

### **2.8.2.2 *Arcobacter* in der Putenschlachtung**

Bisherige Studien belegen, dass *Arcobacter* spp. auf vielen Geflügelkarkassen und anderen Fleischprodukten nachzuweisen sind (OHLENDORF und MURANO, 2002; ROHDER et al., 2007; HOUF et al., 2000; MORITA et al., 2004).

Hinsichtlich des Vorhandenseins von *Arcobacter* spp. in Geflügelprodukten gibt es eine einheitliche wissenschaftliche Sichtweise. Unklar ist jedoch der Übertragungsweg von *Arcobacter* auf die Karkassen. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden in den letzten Jahren viele Studien mit dem Ziel durchgeführt, Gefahrenpunkte während des Schlachtens zu entdecken, zu analysieren und zu kontrollieren, um dem Verbraucher ein sicheres Lebensmittel tierischer Herkunft bieten zu können.

Geflügelschlachthöfe haben immer das gleiche Funktionsprinzip. Die Schlachttiere passieren im Schlachthof zunächst die unsaubere „schwarze“ Seite. In diesem Funktionsbereich befindet sich der Anlieferungs- und Wartebereich der Tiere, die Transportkistenwaschanlage, die Betäubungsvorrichtung, die Entblutbahn und der Brühvorgang und das Entfedern der Tiere. Nach der Entfederung wird das Geflügel in eine andere Förderkette umgehängt, die in den sauberen „weißen“ Bereich führt. Hier gelten strengere Hygienevorschriften. Das abwechselnde Betreten des schwarzen und des weißen Bereiches ist z.B. untersagt. Im weißen Bereich beginnt die eigentliche Fleischgewinnung mit der Eviszation der Tiere und der gesetzlich vorgeschriebenen Fleischuntersuchung durch amtliche Fachassistenten. Anschließend werden die Karkassen einige Stunden gekühlt, um daraufhin als Ganzes verpackt, als Teilstücke oder komplett zerlegt in den Handel zu gelangen.

Der eigentliche Schlachtprozess beginnt mit dem Aufhängen der Tiere an den Ständern in ein Förderband. Mit dem Kopf nach unten hängend durchlaufen sie ein Wasserbad, indem sie durch Stromstöße betäubt werden. Anschließend erfolgt die Eröffnung der Halsgefäße entweder durch einen manuellen oder maschinellen Schnitt. Durch diesen Blutentzug werden die Tiere getötet. Im anschließenden Brühvorgang werden die Tiere über einen Zeitraum von zwei bis drei Minuten in heisses Wasser getaucht. Durch diese Behandlung werden die Federn aus den Follikeln gelöst, was das sich anschließende maschinelle Entfedern erleichtert. Für das Brühen gibt es zwei verschiedene Verfahren. Beim Niedrigbrühverfahren beträgt die Wassertemperatur 50° - 53°C und wird bei Geflügel verwendet, welches als Frischfleisch direkt in den Handel soll. Beim Hochbrühverfahren beträgt die Wassertemperatur 55° - 60°C. Bei diesen Temperaturen wird die Epidermis der Tiere stärker beschädigt als beim Niedrigbrühverfahren. Diese so behandelten Tiere werden vor allem tiefgefroren vermarktet.

*Campylobacter* und *Arcobacter* sind oft auf Geflügelkarkassen nachgewiesen worden (HARRASS et al., 1998; ATABAY und CORRY, 1998; HOUF et al., 2001a, 2002a; HOUF, 2005). Die oberflächliche Belastung der Karkassen mit *Campylobacter* hat ihren Ursprung in der fäkalen Kontamination während des Schlachtens, v. a. während des Rupfens und der Eviszation (RASSCHERT et al., 2006). Die Tiere in den Stallungen werden durch horizontalen Eintrag mit *Campylobacter* infiziert. Nachdem der Erreger in den Stall vorgedrungen ist, verbreitet er sich schnell über die ganze Herde und verbleibt bis zur Schlachtung im Gastrointestinaltrakt der Tiere (NEWELL und FEARNLEY, 2003).

VAN DRIESSCHE und HOUF (2006) wiesen *Arcobacter* in den Transportkäfigen nach und folgerten aus dieser Tatsache, dass diese Erreger evtl. die Kloakenregion der Puten kontaminieren und so den positiven Nachweis von Kloakentupferproben aus den Studien von KABEYA et al. (2003) und ATABAY et al. (2006) erklären könnten. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass der Zeitpunkt der Probenahme und das Probenahmeverfahren einen bedeutenden Einfluss auf das Studienergebnis und somit auch auf die dazugehörigen Schlussfolgerungen haben (VAN DRIESSCHE und HOUF, 2006).

Weitere Studien belegen, dass Transportkäfige des Öfteren nicht gründlich genug gereinigt werden und somit eine mögliche Infektions- bzw. Kontaminationsquelle darstellen (JACOBS-REITSMA und BOLDER, 1998; MEAD et al., 1994).

Autoren, die *Arcobacter* nicht als natürlichen Bewohner der Darmflora ansehen, sehen das Wasser, welches während des Schlachtprozesses zur Reinigung der Karkassen dient, als Ursache der Kontamination. Im Gegensatz dazu steht die Aussage von HO et al. (online, chapter 4), die den Übertragungsweg von *Arcobacter* dem von *Campylobacter* gleichsetzen, da sie *Arcobacter* im Gastrointestinaltrakt der Tiere nachweisen konnten und somit zu der Erkenntnis kamen, dass diese Erreger über den Darmtrakt der Tiere in den Schlachthof gelangen und der automatisierte Schlachtprozess Ursache für die Ausbreitung des Bakteriums vom Darmtrakt auf die Karkassen ist.

Des Weiteren sind die Autoren der Meinung, dass das verwendete Schlachtwasser keine Rolle beim Eintrag von *Arcobacter* in den Schlachthof spielt. Vielmehr sehen HO et al. (online, chapter 4) kontaminiertes Brühwasser als möglichen Ort für Kreuz-Kontaminationen innerhalb einer Herde, aber auch zwischen verschiedenen Herden, da einige *Arcobacter* spp. die im Brühwasserbehälter vorherrschenden Temperaturen von 52°C für drei Minuten überlebten und somit auf nachfolgende Tiere übergehen könnten. Diese These wird durch eine Veröffentlichung von VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) unterstützt. In ihren Untersuchungen konnten sie ein mehrminütiges Überleben von *A. butzleri* bei 52°C feststellen, wohingegen die Überlebensrate von *A. butzleri* bei 60°C deutlich abnahm. Interessant ist auch die Tatsache, dass *Arcobacter* spp. in Anwesenheit von organischem Material verglichen mit reinem Trinkwasser wesentlich länger überleben (VAN DRIESSCHE und HOUF, 2008).

Über die Prävalenz von *Arcobacter* spp. in Putenfleisch ist bisher wenig bekannt. ANDERSEN et al. (2007) stellten bei verpackungsfertigen Karkassen in den USA eine *Arcobacter*-Belastung von 93 % fest. In einer weiteren Studie durch MANKE et al. (1996) konnten im Januar und Februar in 92 % der mechanisch entbeinten Puten *Arcobacter* nachgewiesen werden. In den Proben von Juli und August desselben Jahres wurden in 83 % der Putenproben *Arcobacter* isoliert. 1998 veröffentlichten MANKE et al. eine weitere Studie über die Prävalenz von *Arcobacter* in Putenfleisch. In ihren Untersuchungen konnten sie eine Belastung in 77 % der Proben nachweisen. Ergebnisse über Prävalenzen von *Arcobacter* in deutschem Putenfleisch liegen ebenfalls nur unzureichende Ergebnisse vor. In einer Veröffentlichung von STINY et al. (2006) konnten die Untersucher in 7 von 14 Putenproben (50%) *Arcobacter* spp. feststellen. Weitere Ergebnisse über die Prävalenz von *Arcobacter* in deutschem Putenfleisch liegen nicht vor.

### **2.8.2.3 *Arcobacter*- Prävalenz bei Geflügelfleisch im Einzelhandel**

In den letzten Jahren wurden *Arcobacter* spp. regelmäßig in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nachgewiesen (HOUF et al., 2001; GOLLA et al., 2002; OHLENDORF und MURANO, 2002). Studien hierüber bewiesen, dass vor allem Geflügelfleisch häufiger als rotes Fleisch vom Schwein oder Rind kontaminiert ist (WESLEY, 1996). Durch diese Tatsachen rückt das im Einzelhandel käuflich zu erwerbende Lebensmittel immer mehr in den Fokus als mögliche Quelle einer Infektion mit *Arcobacter* spp. für den Menschen. Bei einer Untersuchung in Spanien konnten in 53% der Fälle *Arcobacter* spp. im Geflügelfleisch nachgewiesen werden (GONZÁLEZ et al., 2000). In einer australischen Studie wurden aus drei unterschiedlichen geographischen Regionen Fleischproben aus dem Supermarkt und vom Schlachter untersucht. Insgesamt waren bei dieser Untersuchung 73% der getesteten Geflügelproben positiv für *Arcobacter* spp., wobei in der Region A in 100% der Proben *Arcobacter* nachgewiesen werden konnte (RIVAS et al., 2004). KABEYA et al. (2004) sammelten 100 Geflügelfleischproben in 7 verschiedenen Einzelhandelsgeschäften in Japan. Insgesamt konnten in 23% der Proben *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden, wobei *A. butzleri* mit 15% den höchsten Anteil hatte. In 5% der Fälle wurden Kontaminationen mit mehr als einer Spezies nachgewiesen.

## **2.9 Risikomanagement**

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch keine definitive Verbindung zwischen einer humanen Erkrankung und *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Dennoch steigen die Bedenken gegenüber diesen Erreger hinsichtlich der öffentlichen Gesundheit. Dies ist auf das breite Vorkommen in Lebensmitteln zurückzuführen. Der Hauptfokus des Interesses liegt zur Zeit auf rohen Fleischprodukten. Des Weiteren stellt unpasteurisierte Milch eine weitere Kontaminationsquelle für den Menschen dar. Da die Rolle von *Arcobacter* als humanpathogener Erreger noch weiterer Untersuchungen bedarf, ist ein vorbeugender Verbraucherschutz ratsam. Maßnahmen gegen dieses Bakterium sollten auf die Reduktion oder die Elimination aus der menschlichen Nahrungskette abzielen. Der fäkale Eintrag von lebensmittelassoziierten humanpathogenen Erregern durch Schlachttiere in den Schlachthof ist eng mit der Gefahr der Karkassenkontamination durch den Schlachtprozess korreliert



(BONARDI et al., 2001; BEACH et al., 2002). Im Hinblick auf das Gesundheitsrisiko, welches durch das zoonotische Potenzial von *Arcobacter* gegeben ist, ist es von essenzieller Bedeutung, die Karkassenkontamination während des Schlachtprozesses zu reduzieren. Aus diesem Grunde ist die konsequente Einhaltung der Schlachthygiene von zentraler Bedeutung in der Fleischproduktion. Im Rahmen des HACCP Konzeptes sollten prozessbegleitende Kontrollpunkte eingebracht und ein regelmäßiges mikrobiologisches Karkassenmonitoring durchgeführt werden. Des Weiteren sollten vorbeugende Maßnahmen, wie z.B. die Einführung der guten Herstellungspraxis und ansteigende Qualitätsanforderungen während der Aufzucht und der Schlachtung der Tiere eingeleitet werden.

Neben der Festlegung eines standardisierten Nachweis- und Isolationsverfahren für *Arcobacter* spp. sollten noch weitere Studien hinsichtlich der Prävalenz von *Arcobacter* bei Patienten mit einer Durchfallerkrankung durchgeführt werden, um die Rolle und die potenzielle Virulenz dieses Bakteriums weiter abklären zu können.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Probenahme

Die Probenahme erfolgte monatlich an einem Schlachthof in Nordwestdeutschland. Die Schlachtkapazität des Betriebes lag durchschnittlich bei 2700 Hennen und 2300 Hähnen in der Stunde. Insgesamt wurden 519 Putenproben qualitativ bzw. quantitativ auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. untersucht. Eine genaue Angabe über die genommenen Proben ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Eine Stunde nach Schlachtbeginn wurden die ersten Tiere beprobt, wobei die Probenahme prozessbegleitend verlief und die Karkassenproben an vier unterschiedlichen Stellen entnommen wurden. Es wurden zunächst alle Proben eines Tieres innerhalb der Schlachtkette gesammelt bevor die Proben des nächsten Tieres gezogen wurden, um eine möglichst homogene Verteilung der entnommenen Proben zu gewährleisten.

Die Probenahme betraf folgende Stationen:

<u>Probenahme im Schlachthof:</u>	<u>(Bezeichnung in Tabellen)</u>
- Karkassen nach dem Brühen und Entfedern	(K1)
- Karkassen nach der Eviszeration	(K2)
- Karkassen vor der Kühlung	(K3)
- Karkassen nach der Kühlung	(K4)
<u>Probenahme an den zerlegten Puten:</u>	<u>(Bezeichnung in Tabellen)</u>
- Oberkeulen	(OK)
- Brustabschnitte	(BA)
- Medaillons	(M)
- Flügel	(F)

Die Entnahme der Proben wurde mit sauberer, schlachthofeigner Schutzkleidung nach den Hygienevorschriften des Betriebes durchgeführt. Vor Betreten der Schlachthalle wurden noch ein Mundschutz und saubere Nitril-Einmalhandschuhe angelegt.

**Tab. 2:** Tabellarische Übersicht der qualitativ und quantitativ untersuchten Proben an den jeweiligen Stationen pro Monat. a: qualitativ; b: quantitativ; K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

Monat	März		April		Mai		Juni		Juli		August		Sept.		Nov.		total	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
<b>K1</b>	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45	45
<b>K2</b>	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45	45
<b>K3</b>	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	25	25
<b>K4</b>	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45	45
<b>F</b>	3	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	24	18
<b>OK</b>	8	0	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	43	30
<b>M</b>	3	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	24	18
<b>BA</b>	3	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	24	18
<b>total</b>	32	15	29	15	44	44	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	275	244

Die Karkassen und zerlegten Tierkörper Teile (Flügel, Oberkeulen, Brustabschnitte und Medaillons) wurden direkt aus dem Schlacht- bzw. Zerlegeband genommen. Die Auswahl der Proben war zufällig. Die Proben wurden in sauberen und beschrifteten Plastikbeuteln gelagert und eng verschlossen bei +2°C gekühlt zum Untersuchungslabor transportiert.

### 3.2 Bearbeitung der Proben im Labor

Die entnommenen Proben wurden nach in der Literatur beschriebenen Methoden (SNELLING et al., 2006; HOUF et al., 2001a), sowohl qualitativ als auch quantitativ auf das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. untersucht. Im Gegensatz zum Nachweis von *Salmonellen*, *Campylobacter* und anderen pathogenen Bakterien, gibt es für den Nachweis von *Arcobacter* spp. noch keine einheitliche ISO- Norm.

### **3.2.1 Qualitative Untersuchung der Proben mit Selektivanreicherung**

Für die qualitative Untersuchung wurden je 10 g der Geflügelteilproben in sterile Erlenmeyerkolben eingewogen und anschließend mit *Arcobacter* – Bouillon (Oxoid) auf 100g aufgefüllt und für 48 h  $\pm$  2 h bei 25° C bebrütet.

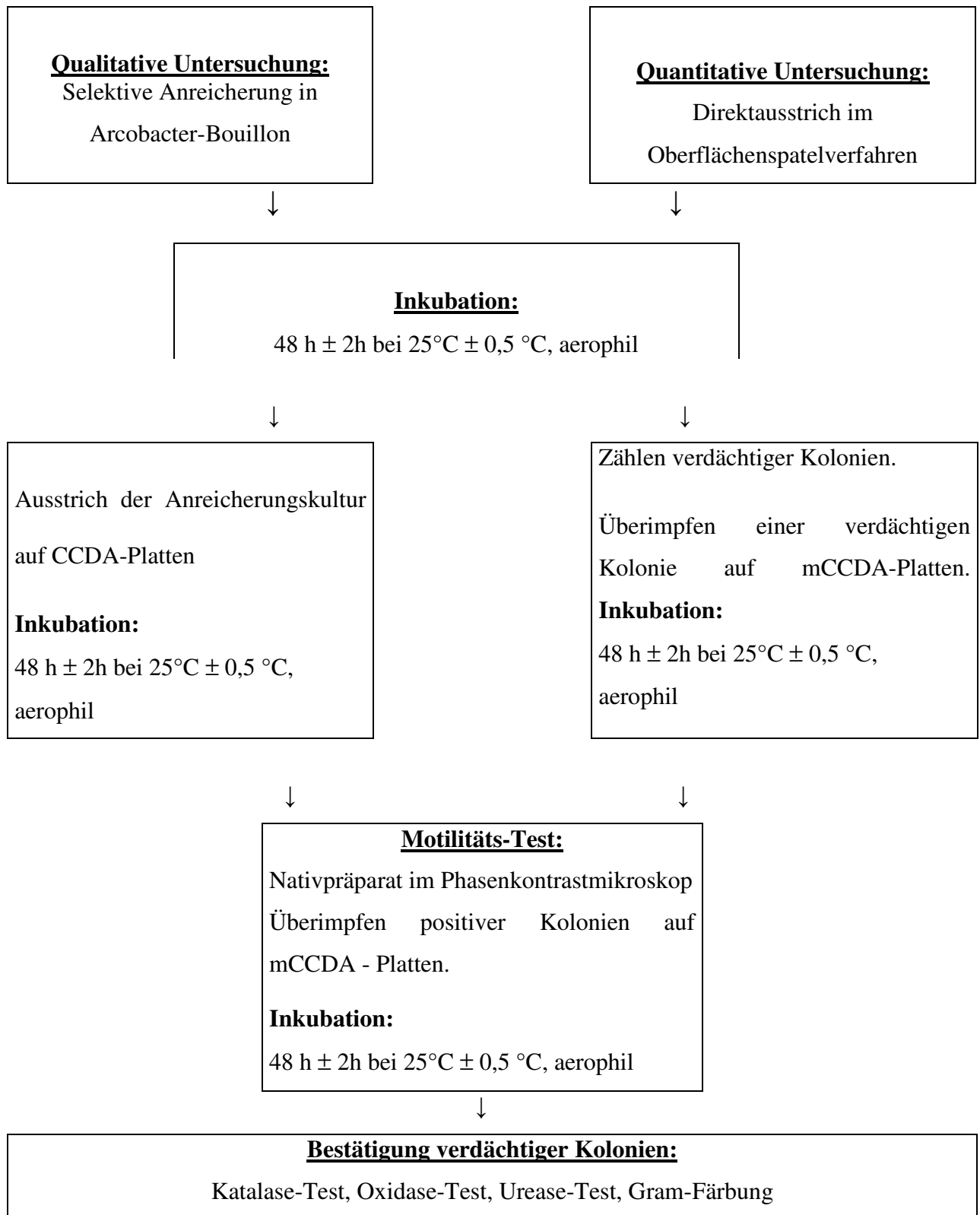
Für die qualitative Untersuchung der Putenhaut-Proben wurde 1 ml Suspensionsflüssigkeit des Homogenisats aus dem Stomacherbeutel in zuvor mit 9 ml *Arcobacter*-Bouillon gefüllten Reagenzgläser überführt und ebenfalls bei 25°C für 48 h  $\pm$  2 h bebrütet.

Nach dieser Voranreicherung wurde ein Aliquot von 10 $\mu$ l mittels einer Öse auf die selektiven m-CCDA-Platten (Oxoid) ausgestrichen und wiederum bei 25° C für 48 h  $\pm$  2 h bebrütet. Die Bewertung der Koloniemorphologie erfolgte anhand der optisch gewachsenen Kolonien, wobei die Platten bei zu starker Begleitflora wiederum auf m-CCDA – Platten überimpft wurden um Reinkulturen zu erhalten. In der Abbildung 2 ist das Fließschema der qualitativen und quantitativen Methode dargestellt.

### **3.2.2 Quantitative Untersuchung und Nachweisrate aus der quantitativen Untersuchung**

Die Geflügelhaut- und die Geflügelteilstück-Proben wurden einer quantitativen Untersuchung im Direktausstrich mittels Oberflächenspatelverfahren unterzogen.

Von den einzelnen Proben wurden insgesamt 20 cm<sup>2</sup> große Stücke aus der Haut bzw. aus den Geflügelteilstücken ausgestanzt und in sterile Stomacher-Beutel überführt und unter Zugabe von 100 ml 0,85 %- NaCl / 0,1 %-Pepton-Wasser 120 Sekunden lang im Stomacher homogenisiert. Aus diesem Homogenisat wurde dann die Nachweisrate von *Arcobacter* spp. aus der quantitativen Untersuchung geführt. Danach wurde aus dieser so gewonnenen Flüssigkeit eine dezimale Verdünnungsreihe von 0 bis -3 erstellt und dann jeweils von jeder Verdünnungsstufe 0,1 ml auf mCCDA-Platten im Doppelansatz überführt. Die so aufbrachte Suspension wurde mit sterilen Spateln auf den Platten verteilt.



**Abbildung 2:** Fließschema zur qualitativen und quantitativen Untersuchung auf *Arcobacter* spp.

### 3.3 Inkubation

Die Erlenmeyerkolben wurden mit steriler Alufolie verschlossen und für 48 h ± 2 h bei 25 °C ± 0,5 °C in einer aeroben Atmosphäre in einem Inkubator (Fa. Memmert) bebrütet. Nach diesem Anreicherungs-schritt wurde ein Aliquot der Anreicherungen von ca. 10µl mit einer sterilen Impföse auf mCCDA - Selektivnährböden ausgestrichen. Eine weitere Bebrütung für 48 h ± 2 h bei 25 °C ± 0,5 °C unter aeroben Bedingungen schloss sich an. Nach diesem Bebrütungsschritt wurden die mCCDA-Platten auf das Vorkommen von *Arcobacter* untersucht. Die verdächtigen Kolonien wurden abgenommen, auf einen mCCDA- Agar überimpft und weiter biochemisch getestet.

### 3.4 Bestätigung *Arcobacter*-verdächtiger Kolonien

Von den *Arcobacter*-verdächtigen Kolonien wurde zunächst eine Reinkultur angelegt, indem eine Einzelkolonie auf eine m-CCDA-Platte überimpft wurde.

	Gramfärbung	Beweglichkeit	Katalase	Oxidase	Urease	aerobes Wachstum
<i>A. butzleri</i>	-	+	v	+	-	+
<i>A. cryaerophilus</i>	-	+	+	+	-	+
<i>A. skirrowii</i>	-	+	+	+	-	+
<i>A. nitrofigilis</i>	-	+	+	+	+	+
<i>C. coli</i>	-	+	+	+	-	-
<i>C. fetus ssp. fetus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>C. fetus ssp. venerealis</i>	-	+	v	+	-	-
<i>C. jejuni ssp. jejuni</i>	-	+	+	+	-	-
<i>C. lari</i>	-	+	+	+	v	-

**Abbildung 3:** Biochemische Kriterien zur Unterscheidung von *Arcobacter* spp. und *Campylobacter* spp.; +: positiv; -: negativ; v: stammabhängige Reaktion.

Die nach 48 h  $\pm$  2 h bei 25° C unter aeroben Bedingungen gewachsenen Kolonien wurden daraufhin unter dem Phasenkontrastmikroskop (Axioskop 40, Zeiss) einer Motilitäts- und Morphologie-Prüfung unterzogen. Nur Bakterien, welche die typische korkenzieherartige Beweglichkeit aufwiesen und weiterhin auch die typische S-förmig gewundene Struktur zeigten wurden den weiterführenden Reaktionen, welche in der Abb. 3 aufgelistet sind, unterzogen.

Zur Überprüfung der Kolonie-Reinheit wurde eine Gramfärbung durchgeführt, wobei ebenfalls das Gramverhalten und die Zellmorphologie überprüft werden konnte. Die als Gram-negativ eingeordneten Kolonien wurden auf Katalase- und Oxidase-Reaktionen überprüft. Konnten alle Reaktionen als positiv eingestuft werden, schloss sich diesen Untersuchungen noch der Urease-Test an, bevor die Isolate bei – 80°C eingefroren wurden, um für die molekulargenetischen Untersuchungen konserviert zu werden.

### **3.5 Cryokonservierung**

*Arcobacter*-verdächtige Isolate wurden im Mikrobanksystem (Cryobank, Fa. Mast Diagnostica) eingefroren. Die Konservierung erfolgte nach Herstellerangaben in einem Kunststoffröhrchen mit oberflächlich porösen Kügelchen. Mit einer sterilen Öse wurde Koloniematerial einer 48 h  $\pm$  2 h alten Reinkultur abgenommen und in dem flüssigen Medium des Cryoröhrchens verteilt. Anschließend wurde das Röhrchen verschlossen und gründlich geschüttelt, ohne dass eine zu starke Schaumbildung auftrat. Gelöste Bakterien konnten sich so an die poröse Oberfläche der Kügelchen anheften. Mit Hilfe von sterilen Pastetten wurde dann die Flüssigkeit im Röhrchen komplett abgesogen. Anschließend wurden die mit Probennummer und Datum beschrifteten Röhrchen fest verschlossen und bei -80°C in einem Tiefgefrierschrank gelagert.

Eine Wachstumskontrolle der Isolate wurde etwa 10 Tage nach dem Einfrieren durchgeführt. Zur Reaktivierung wurde mit einer sterilen Öse ein Kunststoffkügelchen aus dem Isolatentröhrchen entnommen und auf eine CCDA-Platte ausgestrichen. In der Zeit, in der die Isolate ausserhalb des Gefrierschranks waren, wurden sie in einem Cryoblock (Fa. Mast Diagnostica) aufbewahrt, um ein antauen zu verhindern.

Die überimpften CCDA-Platten wurden dann bei 25°C für 48 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Neben der Wiederbelebarkeit der Bakterien konnte auch die Reinheit der Isolate überprüft werden.

### **3.6 Nachweis von *Arcobacter* spp. mittels molekulargenetischer Methoden**

#### **3.6.1 multiplex – PCR**

##### **3.6.1.1 DNA – Isolierung**

Die DNA-Gewinnung der zu untersuchenden *Arcobacter* Isolate wurde nach den Anwendungsempfehlungen des Dneasy Gebrauchskits (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Eine Impföse der Reinkultur wurde in ein mit 1,5 ml TE-Puffer gefülltes Eppendorf Gefäß überführt und mit einem Vortexer (IKA, Staufen) homogenisiert. Von dieser Suspension wurden 30 µl Probenmaterial in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K versetzt. Nach erneutem Vortexen wurde die Probe 1 Stunde bei 56°C lysiert. Im nächsten Schritt wurden je 200µl AL-Puffer und 99%iges Ethanol in das Reaktionsgefäß verbracht. Zwischen diesen Schritten wurden die Proben gut gemischt, um sie anschließend auf die DNeasy Minisäule mit einem dazugehörigen 2 ml Reaktionsgefäß zu pipettieren. Nach einer Laufzeit von 1 min bei 8000 U/min in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg) wurden die Minisäulen auf ein neues Reaktionsgefäß versetzt. Das flüssigkeitsgefüllte Gefäß wurde verworfen. Anschließend wurde das in der Minisäule anhaftende Pellet zweimal mit je 500µl der im Kit enthaltenen Puffer-Lösungen gewaschen. Zuletzt wurde die DNA mit Hilfe von 200µl des dritten Puffers aus der Minisäule gewonnen.



### 3.6.1.2 Durchführung von PCR und Elektrophorese

Die genomische DNA der untersuchten Proben wurde mittels eines Hot Star Taq Master Mix Kits (Quiagen, Hilden) und einem Flexcycler (analytika, Jena) amplifiziert. Das für die PCR verwendete Reaktionsgemisch enthielt je 25,2µl, bestehend aus 2µl Bakterien DNA, 0,2µl Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), 1µl dNTPs (Roth, Karlsruhe), 2,5µl 10x PCR-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 15,5µl destilliertes Wasser und 2µl Primer-Mix bestehend aus den Primern ARCO, BUTZ, CRY1, CRY2 und SKIR (MWG Biotech AG, Ebersberg) (Tab. 3).

Das Temperaturprofil für die PCR gestaltete sich wie folgt: einem initialen Schritt für drei Minuten bei 95°C folgte die Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C, die Primerhybridisierung für 30 Sekunden bei 55°C und die Polymerisation für eine Minute bei 72°C. Nach 35 Zyklen wurden die amplifizierten Proben auf 4°C heruntergekühlt und bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Es wurden 8µl des gewonnenen Produktes auf ein 1,5%-iges, mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel aufgebracht und für 40 min bei 200 V in 1x TBE-Puffer der Elektrophorese ausgesetzt. Die visuelle Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht nach dem INTAS- System (INTAS, Göttingen).

**Tab. 3:** Übersicht der verwendeten Primer bei der PCR und ihre jeweiligen Basensequenzen.

<i>Primer</i>	<b>Sequenz 5' – 3'</b>
ARCO	CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC
BUTZ	CCT GGA CTT GAC ATA GTA AGA ATG A
SKIR	GGC GAT TTA CTG GAA CAC A
CRY1	TGC TGG AGC GGA TAG AAG TA
CRY2	AAC AAC CTA CGT CCT TCG AC

### 3.6.2 Dye Terminator Cycle Sequencing

Das dye terminator cycle sequencing (DTCS) ist eine Methode, um die DNA- Sequenz, d. h. die Nukleotidabfolge in einem DNA- Molekül, durch verschiedene Reaktionsschritte visuell sichtbar zu machen.

Zunächst wurden überschüssige Primer- und dNTPs in den PCR-Produkten mit Hilfe einer enzymatischen Reinigung vor der DTCS-Reaktion entfernt. Dazu wurde das Exo-SAP-IT<sup>®</sup> Kit verwendet, welches mit einer Mischung aus Exonuklease und Shrimp Alkalischer Phosphatase arbeitet. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 1,5 µl Exo-SAP-IT<sup>®</sup> Enzym-Mix in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß gemischt und nach Hersteller-Protokoll für 15 Minuten bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der zugesetzten Enzyme folgte dann für 15 Minuten eine Temperaturerhöhung auf 80°C.

Die DTCS-Reaktion wurde mit dem GenomeLab<sup>™</sup> DTCS Quick Start Kit durchgeführt. In einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß wurde der DTCS-Reaktionsansatz abweichend von den Herstelleranweisungen gemäß Tabelle 4 angesetzt.

Die DTCS-Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Temperatur-Zeit-Programm: 30 Zyklen, bestehend aus einer Denaturierungs-Phase bei 94°C für 20 Sekunden, einer Annealing-Phase bei 50°C für 20 Sekunden und einer Elongations-Phase bei 60°C über 2,5 Minuten. Nach dem 30. Zyklus wurden die DTCS-Ansätze auf 4°C gekühlt.

In der Folge wurde die, nun mit Nukleotid-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierte, DNA aus den DTCS-Reaktionsansätzen zügig in einer Ethanol-Fällung gereinigt, um sie dann in einen nicht wässrigen Formamid-Puffer (Sample Loading Solution) aufzunehmen. Dazu wurden zu jedem DTCS-Reaktionsansatz 14,5 µl Aqua bidest pipettiert und der Ansatz dann jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden pro Ansatz 3 µl Natrium Acetat (3M) sowie 62,5 µl 99 %iges Ethanol zugesetzt. Nachdem die Komponenten im Vortexer gemischt wurden, folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 Minuten wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 3 Minuten an. Der Überstand wurde ebenfalls vorsichtig verworfen. In der Folge wurde noch einmal kurz anzentrifugiert und der restliche Überstand mit einer 10 µl-Mikropipette vom Pellet entfernt.

**Tabelle 4:** Protokoll zur Herstellung eines 20 µl DTCS-Reaktionsansatzes

<b>Komponente</b>	<b>Ausgangs-Konzentration</b>	<b>eingesetztes Volumen [µl]</b>
Aqua bidest	---	12,25
Sequenzierungs-Primer	10 µM	0,75
DTCS Quick Start Master Mix	---	2
Sequenzierungs-Puffer	10 mM MgCl <sub>2</sub> 400 mM Tris-HCl [pH 9,0]	3
enzymgereinigtes PCR-Produkt	10 ng/µl	2

Nach ca. 15 Minuten Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit Hilfe des Vortexers in 30 µl Sample Loading Solution (SLS) gelöst. Inkubation und Trocknung erfolgten, zur Schonung der lichtempfindlichen DTCS-Fluoreszenzfarbstoffe, im Dunkeln.

Für die Analyse der Sequenzen wurde das in 30 µl resuspendierte Pellet in eine 96-Well Probenmikrotiterplatte (Beckman Coulter, Krefeld) pipettiert und jeweils mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Eine 96-Well Puffermikrotiterplatte wurde entsprechend der Probenanzahl pro Kammer mit 250 µl Separationspuffer befüllt. Der Kapillarsequenzierer wurde gemäß Herstelleranweisung mit Separations-Gel und den Separations-Kapillaren bestückt. Die Probenplatte und die Pufferplatte wurden in den Kapillarsequenzierer geladen und die Sequenzanalyse gestartet. Die Injektion der markierten Nukleotide in die Kapillaren erfolgte für 10 Sek. bei 2,0 kV Injektionsspannung. Die anschließende Separation bei einer Spannung von 3,0 kV dauerte 110 Min. Die Kapillarentemperatur betrug während der Sequenzanalyse 52°C.

Die Sequenzrohdaten, wurden mithilfe der zum Kapillarsequenzierer Ceq 8000 gehörenden Software ausgewertet. Jede Sequenz wurde visuell kontrolliert und dabei die jeweilige Vorwärtssequenz mit der Rückwärtssequenz verglichen.

### 3.7 Material und Geräte

Im Folgenden werden die in den Untersuchungen eingesetzten Gebrauchsgegenstände, Geräte und Reagenzien aufgelistet:

#### Mikrobiologie:

Anaerobiertöpfe BBL GasPak	Beckton&Dickinson,USA
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Aqua bidest	Roth, Karlsruhe
Bactident® Oxidase	Merck, Darmstadt
Bechergläser 250 ml (Schott-Duran)	Roth, Karlsruhe
Brutschrank 25°C	Memmert, Schwabach
Bunsenbrenner Labogaz 206	Camping Gaz, Hungen
Cryobank, Cryoröhrchen	Mast Diagnostica, Reinfeld
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Erlenmeyerkolben (Schott-Duran)	Roth, Karlsruhe
Homogenisationsbeutel	VWR international, Darmstadt
Immersions-Öl	Carl-Zeiss Microlmaging
Kühlgefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop Axioskop 40	Carl-Zeiss Microlmaging GmbH, Jena
NaCl	Merck, Darmstadt
Objektträger	IDL GmbH + Co. KG,
NidderauParaffinöl	Merck, Darmstadt
Pastetten	bioMérieux GmbH, Nürtingen
pH-Meter	Landgraf, Langenhagen
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Hamburg
Pipetten 1ml ,10 ml	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe
Schraubgläser 100ml u. 500 ml (Schott-Duran)	Roth, Karlsruhe
Schutzhandschuhe	NOBA, Wetter
Spatel	Sarstedt, Nümbrecht

Sterilisator	Memmert, Schwabach
Stomacher seward 400	Ronnenberger Laborbedarf, Ronnenberg
Vakuumbbeutel	Hannoversche Gewürzmühle, Hannover
Vortexer	IKA, Staufen
Waage LC 2200P	Sartorius, Göttingen
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck, Darmstadt

**PCR- Labor:**

Agarose NEEO, für PCR	Roth, Karlsruhe
Anaerobiertöpfe BBL GasPak	Beckton & Dickinson, USA
Aqua bidest	Roth, Karlsruhe
Brutschrank 25°C	Memmert, Schwabach
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
DNA-Isolierungs-Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Elektrophorese- Gelkammer	Life Technologies, Eggenstein
Elektrophorese-Steuereinheit	BIO-RAD Laboratories, USA
Enzymatisches Reinigungs-Kit	USB Europe GmbH, Staufen
Gel-Gießkammer	Life Technologies, Eggenstein
Größenmarker, für PCR	Roche Diagnostik, Mannheim
Heizblock	Lab Tec Int., Burkhardtsdorf
Kühlgefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer, beheizbar	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Hamburg
Pipetten 1ml ,10 ml	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe

Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reagenzgläser	Roth, Karlsruhe
Schutzhandschuhe	NOBA, Wetter
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Schutzbrille	UVEX, Fürth
Zentrifugengefäß	Corning, USA

**Molekularbiologie:**

Aqua bidest	Roth, Karlsruhe
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
DNA-Isolierungs-Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Polymerase (Taq) 5U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Elektrophorese- Gelkammer	Life Technologies, Eggenstein
Elektrophorese-Steuereinheit	BIO-RAD Laboratories, USA
Enzymatisches Reinigungs-Kit	USB Europe GmbH, Staufen
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
Gel-Gießkammer	Life Technologies, Eggenstein
Gel-Lade-Puffer	Sigma-Aldrich, Seelze
Heizblock	Lab Tec Int., Burkhardtsdorf
Kapillarsequenzierer Ceq 8000	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlgefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen
Ladepuffer, Sequenzanalyse	Beckman Coulter, Krefeld
Magnetrührer, beheizbar	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Öl für Sequenzanalyse	Beckman Coulter, Krefeld
Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Hamburg
Pipetten 1ml ,10 ml	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe
Probenmikrotiterplatte	Beckman Coulter, Krefeld
Puffermikrotiterplatte	Beckman Coulter, Krefeld

Reagenzgläser	Roth, Karlsruhe
Schraubgläser 100ml u. 500 ml (Schott-Duran)	Roth, Karlsruhe
Schutzhandschuhe	NOBA, Wetter
Separationsgel	Beckman Coulter, Krefeld
Separationskapillaren	Beckman Coulter, Krefeld
Separationspuffer	Beckman Coulter, Krefeld
Sequenzierungs-Kit	Beckman Coulter, Krefeld
Sterilisator	Memmert, Schwabach
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Schutzbrille	UVEX, Fürth
Vortexer	IKA, Staufen
Waage S-403	Denver instrument, USA
Zentrifugengefäß	Corning, USA

### 3.7.1 Flüssige Medien

Für die Untersuchungen wurden flüssige und feste Kultivierungsmedien der Firma Oxoid benutzt. Im Folgenden wird die Zusammensetzung und Zubereitung der Medien beschrieben.

#### **Arcobacter-Bouillon:**

##### **Zusammensetzung:**

Pepton	18,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Hefeextrakt	1,0 g/l

##### **CAT-Selektiv-Supplement (Oxoid SR0174E)**

Cefoperazon	4,0 mg
Amphotericin B	5,0 mg
Teicoplanin	2,0 mg

##### **Zubereitung:**

12,0 g der Nährbouillon wurden in 500 ml Aqua dest. auf dem Magnetrührer gelöst, der pH-Wert auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt und danach für 15 Minuten bei  $121^\circ \text{C}$  autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Inhalt eines Röhrchens Selektivsupplements mit 4 ml sterilem Aqua

dest. gelöst und in die Nährbouillon gegeben. Die Bouillon wurde gründlich gemischt und anschließend dicht verschraubt in Glasflaschen von Schott-Duran gelagert.

**0,85%-NaCl / 0,1%-Pepton-Lösung**

**Zusammensetzung:**

NaCl	8,5 g/l
Pepton	1,0 g/l

**Zubereitung:**

Die Substanzen wurden in einen Liter Aqua dest. eingewogen und auf dem Magnetrührer gründlich gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Aliquots zu 9 ml wurden einzeln in Reagenzgläser abgefüllt (Verdünnungslösung) und mit Kapsenbergkappen verschlossen, 500ml Erlenmeyerkolben mit 500 ml dieser Lösung beschickt (Spülflüssigkeit) und mit Stopfen verschlossen. Die vorbereiteten Reagenzgläser und Kolben wurden 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.



### 3.7.2 Feste Nährmedien

Im Rahmen dieser Studie wurden die verwendeten festen Nährmedien von der Firma Oxoid als Fertigplatten bezogen. Die Aufbewahrung erfolgt in einem Kühlschrank bei 8°C innerhalb des vom Hersteller angegebenen Haltbarkeitsdatums.

#### **Campylobacter-Selektivagar (mCCDA, blutfrei, Oxoid PO5091A)**

##### **Zusammensetzung:**

Fleischextrakt „Lab-Lemco“	10,00 g/l
Pepton	10,00 g/l
NaCl	5,00 g/l
Bakteriologische Aktivkohle	4,00 g/l
Casein-Hydrolysat	3,00 g/l
Natriumdesoxycholat	1,00 g/l
Eisen-(III)-Sulfat	0,25 g/l
Natriumpyruvat	0,25 g/l
Cefoperazon	0,032 g/l
Amphotericin B	0,01 g/l
Agar	12,00 g/l

Der Agar hatte einen pH-Wert von 7,4 und war tiefschwarz, opak. Seine Haltbarkeit betrug 14 Wochen.

**Mueller-Hinton-Agar mit Schafblut (MHB-Agar)**

**Zusammensetzung:**

Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300g	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l
Defibriertes Schafblut	70,0 ml

Der Agar hatte einen pH-Wert von 7,4 und war signalrot, opak. Seine Haltbarkeit betrug 8 Wochen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitative Untersuchung nach Anreicherung

#### 4.1.1 Ergebnisse nach der Mikrobiologischen Untersuchung

Im Zeitraum von März bis November 2007 wurden an acht verschiedenen Beprobungstagen insgesamt 275 Putenproben aus acht unterschiedlichen Herden mikrobiologisch auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. untersucht. Die Ergebnisse dieser qualitativen Untersuchung sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Verteilung der *Arcobacter*- positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der Mikrobiologischen Untersuchung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n	Anzahl pos. Proben
		275	58 (%)
1	März 2007	32	8 (25,0)
2	April 2007	29	3 (10,3)
3	Mai 2007	44	1 (2,3)
4	Juni 2007	34	6 (17,7)
5	Juli 2007	34	9 (26,5)
6	August 2007	34	9 (26,5)
7	September 2007	34	9 (26,5)
8	November 2007	34	13 (38,2)

Die Ergebnisse in den acht verschiedenen Beprobungsmonaten ergaben nach der qualitativen Untersuchung acht *Arcobacter*- positive Putenherden, d.h. 100 % Prävalenz. Der prozentuale Anteil der positiven Proben variierte im Verlauf der Probenmonate zwischen 2,3 % und 38,2 %. Insgesamt konnten 58 Isolate der Spezies *Arcobacter* zugeordnet werden. Das

entspricht einem prozentualen Anteil von 21,1 %. Die höchste Herden-Prävalenz konnte im November, die niedrigste Herden- Prävalenz im Mai ermittelt werden.

#### 4.1.2 Ergebnisse nach Überprüfung mittels PCR

Die nach den biochemischen Reaktionen in der Mikrobiologie als *Arcobacter*- positiv eingordneten Isolate wurden anschließend einer PCR- Untersuchung unterzogen.

In Tabelle 6 ist die Verteilung der *Arcobacter*- positiven Proben nach dieser molekularbiologischen Untersuchung dargestellt. Insgesamt waren noch 28 der ursprünglich 58 positiven Isolate *Arcobacter*- positiv. Somit reduzierte sich die Nachweisrate nach der Überprüfung mittels PCR im Gegensatz zu den Ergebnissen nach der Mikrobiologischen Untersuchung um 48,3 %. Mit 23,5 % waren die Putenproben im September am höchsten belastet, während die Monate Juni (8,8%), April (6,9%), August (5,9%) und der Monat November mit 2,9 % *Arcobacter*- positiver Proben jeweils unter 10 %- Marke blieben.

**Tabelle 6:** Verteilung der *Arcobacter*- positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der PCR- Untersuchung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n 275	Anzahl pos. Proben 28 (%)
1	März 2007	32	7 (21,9)
2	April 2007	29	2 (6,9)
3	Mai 2007	44	1 (2,3)
4	Juni 2007	34	3 (8,8)
5	Juli 2007	34	4 (11,8)
6	August 2007	34	2 (5,9)
7	September 2007	34	8 (23,5)
8	November 2007	34	1 (2,9)

### 4.1.3 Ergebnisse nach Überprüfung mittels Sequenzierung

Die nach der PCR als *Arcobacter*- positiv eingestuftten Isolate wurden anschließend noch mittels Gensequenzierung näher bestimmt.

Bei dieser Überprüfung konnten 25 der 28 Isolate (89,3 %) als *Arcobacter* spp. verifiziert werden. Dies entspricht einer um 56,9 % niedrigeren Nachweisrate als nach der Mikrobiologischen Untersuchung. Im September wurde mit 23,5 % *Arcobacter*- positiven Isolaten die höchste Nachweisrate festgestellt. Im Untersuchungsmonat März waren es 21,9 %. Die übrigen sechs Untersuchungsmonate waren mit weniger als 10 % mit *Arcobacter* spp. kontaminiert (Tab. 7). Im Mai konnten mittels Sequenzierung keine *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. *Arcobacter* spp. konnten in sieben der acht untersuchten Herden nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 87,5 %.

**Tabelle 7:** Verteilung der *Arcobacter*- positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der Sequenzierung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n	Anzahl pos. Proben
		<b>275</b>	<b>25 (%)</b>
1	März 2007	32	7 (21,9)
2	April 2007	29	2 (6,9)
3	Mai 2007	44	0 (0,0)
4	Juni 2007	34	2 (5,9)
5	Juli 2007	34	3 (8,8)
6	August 2007	34	2 (5,9)
7	September 2007	34	8 (23,5)
8	November 2007	34	1 (2,9)

## 4.2 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung

Im gleichen Probenahmezeitraum wie für die qualitative Untersuchung wurde gleichzeitig eine Nachweisrate über das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. in den 244 Proben aus den acht verschiedenen Putenherden bei der quantitativen Untersuchung erstellt. Bei diesem Untersuchungsverfahren ohne vorherige Anreicherung (s. 3.2.2) wurden die gewachsenen Kolonien den gleichen mikrobiologischen Tests unterzogen wie die Kolonien bei der qualitativen Untersuchung. Anschließend folgte eine Überprüfung der Ergebnisse mittels PCR und Gensequenzierung.

### 4.2.1 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung nach der Mikrobiologischen Untersuchung

Im Gegensatz zu der qualitativen Untersuchung wurden in den Monaten März und Juni keine *Arcobacter* spp. nachgewiesen. Somit liegt die Herdenprävalenz bei dieser Untersuchungsmethode ohne vorherige Anreicherung bei 75 %.

**Tabelle 8:** Nachweisrate der *Arcobacter*- positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach der Mikrobiologischen Untersuchung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n 244	Anzahl pos. Proben 19 (%)
1	März 2007	15	0 (0,0)
2	April 2007	15	6 (40,0)
3	Mai 2007	44	9 (20,5)
4	Juni 2007	34	0 (0,0)
5	Juli 2007	34	1 (2,9)
6	August 2007	34	1 (2,9)
7	September 2007	34	1 (2,9)
8	November 2007	34	1 (2,9)

Die höchste Nachweisrate mit 40 % positiven Isolaten wurde im April festgestellt, während in den Monaten Juli, August, September und November lediglich ein Isolat als *Arcobacter* spp. angesprochen werden konnte (Tab. 8).

Mit insgesamt 19 nachgewiesenen *Arcobacter*- Isolaten liegt die Nachweisrate bei 7,8 %. Dieses Ergebnis ist somit dreimal niedriger als das Resultat nach der qualitativen Untersuchung mit vorheriger Anreicherung.

#### 4.2.2 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung nach Überprüfung mittels PCR

Bei der PCR- Analyse der in der Mikrobiologie aus der quantitativen Untersuchung gewonnenen *Arcobacter*- Isolate konnten Abweichungen hinsichtlich der Ergebnisse festgestellt werden. In Tabelle 9 ist die Verteilung der *Arcobacter*- positiven Proben nach der molekularbiologischen Untersuchung dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine Bestätigung von *Arcobacter* spp. in 17 der 19 untersuchten Proben. Dies entspricht einer Verifizierung von 89,5 %.

**Tabelle 9:** Nachweisrate der *Arcobacter*- positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach der PCR- Untersuchung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n	Anzahl pos. Proben
		<b>244</b>	<b>17 (%)</b>
1	März 2007	15	0 (0,0)
2	April 2007	15	6 (40,0)
3	Mai 2007	44	9 (20,5)
4	Juni 2007	34	0 (0,0)
5	Juli 2007	34	1 (2,9)
6	August 2007	34	0 (0,0)
7	September 2007	34	1 (2,9)
8	November 2007	34	0 (0,0)

Lediglich die beiden Isolate aus den Monaten August und November wurden durch die PCR-Untersuchung nicht bestätigt. Somit gelang durch dieses Untersuchungsverfahren in vier der acht untersuchten Putenherden (50%) ein positiver *Arcobacter*- Nachweis.

#### 4.2.3 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung nach Überprüfung mittels Sequenzierung

Die nach der PCR als *Arcobacter*- positiv eingestuften Isolate wurden anschließend noch mittels Gensequenzierung näher bestimmt. Von den 17 positiven Isolaten konnten 15 (88,2%) durch die Sequenzierung als *Arcobacter* verifiziert werden.

Die Nachweisrate von 40,0 % *Arcobacter*- positiver Proben im April haben sich durch beide nach der Mikrobiologischen Untersuchung anschließenden Verfahren bestätigt (Tab. 10). Lediglich vier der ursprünglich 19 positiven Isolate konnten nicht bestätigt werden. Dies entspricht einer um 21,1 % niedrigeren Nachweisrate gegenüber der Mikrobiologischen Untersuchung.

**Tabelle 10:** Nachweisrate der *Arcobacter*- positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach der Sequenzierung im Jahresverlauf; n = Anzahl untersuchter Proben je Untersuchungstermin.

Untersuchungstermin	Monat	Probenanzahl n	Anzahl pos. Proben
		<b>244</b>	<b>15 (%)</b>
1	März 2007	15	0 (0,0)
2	April 2007	15	6 (40,0)
3	Mai 2007	44	8 (18,2)
4	Juni 2007	34	0 (0,0)
5	Juli 2007	34	0 (0,0)
6	August 2007	34	0 (0,0)
7	September 2007	34	1 (2,9)
8	November 2007	34	0 (0,0)



Die Herdenprävalenz nach der Sequenzierung der Isolate lag mit drei von acht untersuchten Herden bei 37,5 %. Somit ist der *Arcobacter*- Nachweis bei der quantitativen Untersuchung um 50 % niedriger als bei der qualitativen Untersuchung.

### 4.3 *Arcobacter*- Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen

#### 4.3.1 Qualitative *Arcobacter*-Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der mikrobiologischen Untersuchung

Insgesamt wurden 275 Proben von 8 Herden an verschiedenen Stationen der Schlachtung und Verarbeitung mikrobiologisch auf das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. untersucht. Insgesamt waren 21,1 % (n=58) der Proben *Arcobacter*-positiv.

In Tabelle 11 werden die Prävalenzen der einzelnen Probenarten sowie die Anzahl (n) der Proben in % angegeben. Die höchste Prävalenz wurde bei den Oberkeulen-Proben festgestellt. Hier wurden *Arcobacter* bei 37,5 % der untersuchten Proben nachgewiesen.

**Tabelle 11:** *Arcobacter*- positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der qualitativen Untersuchung (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

<b>K1</b> (13/45)	<b>K2</b> (10/45)	<b>K3</b> (4/25)	<b>K4</b> (5/45)	<b>F</b> (3/25)	<b>OK</b> (15/40)	<b>M</b> (2/25)	<b>BA</b> (6/25)
28,9 %	22,2 %	16,0 %	11,1 %	12,0 %	37,5 %	8,0 %	24,0 %

Die Untersuchung der Karkassen zeigte mit 28,9 % für Karkassen nach Brühen und Entfedern den höchsten Prävalenzwert an. Die Anzahl der positiven *Arcobacter*-Proben wird im Verlauf der Schlachtkette zunehmend niedriger. Mit 22,2 % waren die Karkassen nach der Eviszeration am zweithöchsten belastet, gefolgt von den Karkassen vor der Kühlung mit 16%.

Nach der Kühlungsphase konnten noch bei 11,1 % der Proben *Arcobacter* nachgewiesen werden.

#### 4.3.2 Qualitative *Arcobacter*- Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der PCR

Die nach der qualitativen Untersuchung in der Mikrobiologie als *Arcobacter*- positiv eingestuften Isolate wurden anschließend einer PCR- Untersuchung unterzogen. Insgesamt konnten 28 (10,2%) *Arcobacter*- positive Isolate nachgewiesen werden.

In Tabelle 12 werden die Prävalenzen der einzelnen Probenarten sowie die Anzahl (n) der Proben in % angegeben. Nach der PCR- Untersuchung reduzierte sich die *Arcobacter*- Prävalenz bei den Oberkeulen- Proben um 30 %. Bei den Medaillon- und Brustabschnitts- Proben lieferte die PCR- Untersuchung ein identisches Ergebnis wie die Mikrobiologische Untersuchung. Im Durchschnitt reduzierte sich die *Arcobacter*- Prävalenz nach der PCR- Untersuchung in den übrigen Monaten um 7,1 %. Weiterhin ist eine Abnahme der Keimbelastung im Verlauf der Schlachtkette zu beobachten.

**Tabelle 12:** *Arcobacter*- positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der PCR (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

K1	K2	K3	K4	F	OK	M	BA
(10/45)	(6/45)	(2/25)	(2/45)	(1/25)	(3/40)	(2/25)	(2/25)
22,2 %	13,3 %	8,0 %	4,4 %	4,0 %	7,5 %	8,0 %	8,0 %

#### 4.3.3 Qualitative *Arcobacter*- Prävalenz an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Sequenzierung

Die nach der PCR- Untersuchung als *Arcobacter*- positiv eingestuften Isolate wurden anschließend einer Gen- Sequenzierung unterzogen. Dabei wurden 25 Proben (9,1%) der Spezies *Arcobacter* zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Durch die Sequenzierung der gewonnenen Isolate stellte sich heraus, dass die Ergebnisse bei allen Geflügelteilstück- Proben und bei den Karkassen nach der Eviszeration mit den Ergebnissen der PCR- Untersuchung übereinstimmten. Bei den anderen Karkassen reduzierte sich die *Arcobacter*- Prävalenz um durchschnittlich 2,8 %.

**Tabelle 13:** *Arcobacter*-positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der Gensequenzierung (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

<b>K1</b>	<b>K2</b>	<b>K3</b>	<b>K4</b>	<b>F</b>	<b>OK</b>	<b>M</b>	<b>BA</b>
(9/45)	(6/45)	(1/25)	(1/45)	(1/25)	(3/40)	(2/25)	(2/25)
20,0 %	13,3 %	4,0 %	2,2 %	4,0 %	7,5 %	8,0 %	8,0 %

Die durchschnittliche *Arcobacter*- Kontamination bei den Karkassen (9,8%) fiel im Gegensatz zu der Belastung der Teilstück- Proben (6,8%) höher aus. Die prozessbegleitende Abnahme der *Arcobacter*- Prävalenz bestätigte sich auch nach der Sequenzierung. Insgesamt wurden am Ende des Karkassenbandes 17,8 % weniger *Arcobacter*- Isolate gefunden als bei den Karkassen vor der Eviszeration.

#### **4.3.4 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Mikrobiologischen Untersuchung**

Über die quantitative Untersuchung konnte eine Nachweisrate über das Vorkommen von *Arcobacter* spp. erstellt werden. In diesem Untersuchungsverfahren ohne Anreicherung (s. 3.2.2) konnten in 7,8 % (n=19) *Arcobacter* nachgewiesen werden (Tab. 14).

Bei den Geflügelteilstück- Proben wurden nur bei den Oberkeulen in 6,7 % der Proben *Arcobacter* nachgewiesen. Die höchste Belastung mit 22,2 % wurde bei den Karkassen nach der Eviszeration festgestellt. An der nächsten Untersuchungsstation, den Karkassen vor der Kühlung, konnten keine *Arcobacter* spp. mehr nachgewiesen werden, während an der letzten Beprobungsstation wiederum in 4,4 % der Proben *Arcobacter* spp. isoliert werden konnten.

**Tabelle 14:** Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Mikrobiologischen Untersuchung in %. (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

<b>K1</b> (5/45)	<b>K2</b> (10/45)	<b>K3</b> (0/25)	<b>K4</b> (2/45)	<b>F</b> (0/18)	<b>OK</b> (2/30)	<b>M</b> (0/18)	<b>BA</b> (0/18)
11,1 %	22,2 %	0,0 %	4,4 %	0,0 %	6,7 %	0 %	0 %

#### 4.3.5 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels PCR

Die in der Mikrobiologie über die quantitative Untersuchung als *Arcobacter*- positiv eingestuften Isolate wurden ebenfalls einer PCR- Untersuchung unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15:** Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstation nach Überprüfung mittels PCR in %. (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

<b>K1</b> (5/45)	<b>K2</b> (10/45)	<b>K3</b> (0/25)	<b>K4</b> (2/45)	<b>F</b> (0/18)	<b>OK</b> (0/30)	<b>M</b> (0/18)	<b>BA</b> (0/18)
11,1 %	22,2 %	0,0 %	4,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %

Nach dieser Untersuchung waren 17 Proben (7%) *Arcobacter*- positiv. Im Gegensatz zum Vergleich zwischen der Mikrobiologischen- und PCR- Untersuchung aus der qualitativen Untersuchung, wo eine starke Abweichung bei den Ergebnissen festzustellen war, blieb die Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung zwischen diesen

beiden Methoden nahezu konstant. Die beiden aus den Oberkeulen- Proben isolierten *Arcobacter* konnten nach der PCR-Untersuchung nicht bestätigt werden.

#### 4.3.6 Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels Sequenzierung

Die nach der PCR- Untersuchung als *Arcobacter*- positiv eingestuften Proben wurden ebenfalls einer Gensequenzierung unterzogen. Bei den über das quantitative Verfahren gewonnenen Isolaten konnten noch 15 Proben (6,2%) der Spezies *Arcobacter* zugeordnet werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 dargestellt. Die Nachweisrate nach der Sequenzierung weicht nur bei dem Ergebnis bei den Karkassen nach der Eviszeration von der Nachweisrate nach der PCR-Untersuchung ab. An dieser Untersuchungsstation reduzierte sich die *Arcobacter*- Prävalenz von 22,2 % auf 17,8 %, was auch gleichzeitig den höchsten Wert darstellt. Bei den Karkassen vor der Kühlung konnten keine *Arcobacter* nachgewiesen werden. Allerdings bestätigte sich die Tatsache, dass nach dem Kühlprozess in 4,4 % der untersuchten Karkassen, *Arcobacter* spp. isoliert werden konnten.

**Tabelle 16:** Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstation nach Überprüfung mittels Gensequenzierung in %. (n = positiv / n = untersucht); K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

<b>K1</b> (5/45)	<b>K2</b> (8/45)	<b>K3</b> (0/25)	<b>K4</b> (2/45)	<b>F</b> (0/18)	<b>OK</b> (0/30)	<b>M</b> (0/18)	<b>BA</b> (0/18)
11,1%	17,8%	0%	4,4%	0%	0%	0%	0%

#### **4.4 Vergleichende Darstellung der *Arcobacter*- positiven Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden**

##### **4.4.1 Vergleichende Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden**

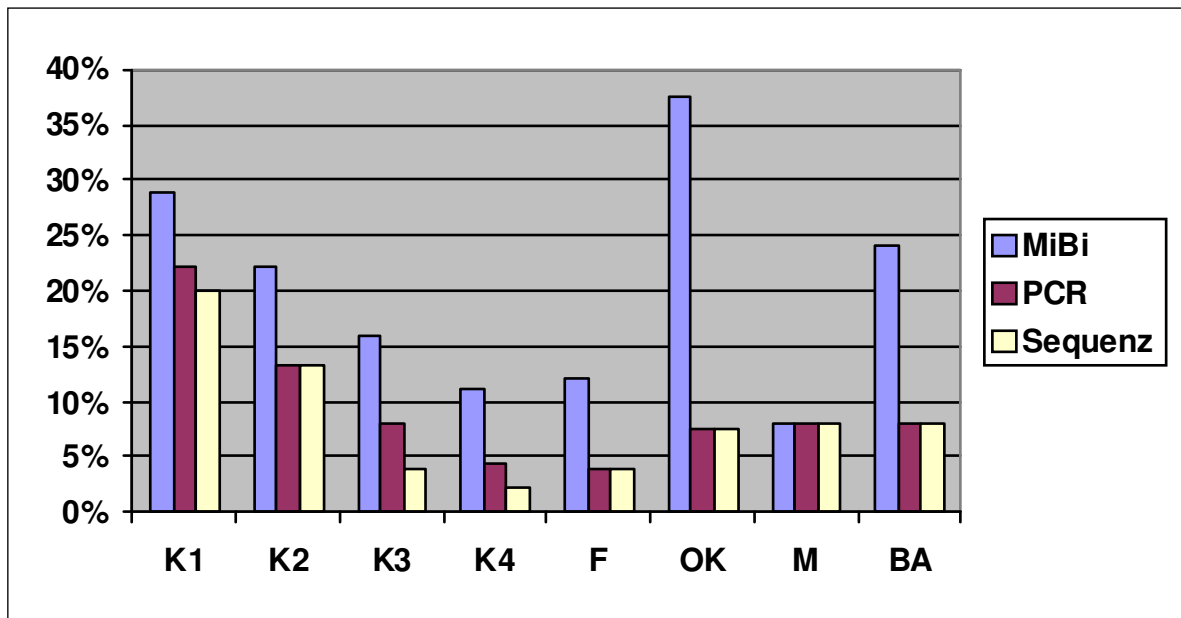
Bei der vergleichenden Darstellung (Tab. 17, Abb. 4) der einzelnen Untersuchungsmethoden an den jeweiligen Untersuchungsstationen fällt auf, dass der positive *Arcobacter*- Nachweis nach der Mikrobiologischen Untersuchung am höchsten ist, sich die Nachweisrate nach den sich anschließenden Untersuchungen jedoch reduziert. Insbesondere der Unterschied in den Ergebnissen nach der Mikrobiologischen Untersuchung und der PCR sind auffällig. So wurden bei den Karkassen nach dem Brühen und Entfedern 28,9 % *Arcobacter*- positive Proben in der Mikrobiologie festgestellt. Dieser Wert korrigierte sich nach der PCR um 6,7 % nach unten und betrug nach der Gensequenzierung mit 20 % *Arcobacter*- positiven Isolaten einen um 8,9 % niedrigeren Wert als nach der Mikrobiologischen Untersuchung (Tab. 17).

Ähnliche Untersuchungsergebnisse konnten bei den Karkassen nach der Eviszeration und bei den Karkassen nach der Kühlung festgestellt werden. Bei den Karkassen vor der Kühlung wurde der prozentuale Wert der *Arcobacter*- positiven Isolate nach der Gensequenzierung um 12 % auf insgesamt 4 % *Arcobacter*- positive Proben korrigiert.

Bei den Geflügelteilstückproben fiel der Anteil der *Arcobacter*- positiven Isolate bei den Oberkeulenproben von 37,5 % auf 7,5 % ab. Bei den Brustabschnittsproben sank der Wert von 24 % auf 8 % und bei den Flügelproben von 12 % auf 4 %. Lediglich die Medaillonproben blieben mit 8 % *Arcobacter*- positiven Proben während der gesamten Untersuchung konstant (Abb. 4). Des Weiteren gibt es bei den Geflügelteilstückproben zwischen den PCR- Ergebnissen und den Ergebnissen nach der Gensequenzierung keinen prozentualen Unterschied im Hinblick auf den positiven *Arcobacter*- Nachweis.

**Tabelle 17:** Vergleichende Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden; K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte; MiBi: Mikrobiologie; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion; Sequenz: Ergebnisse nach der Gen-Sequenzierung.

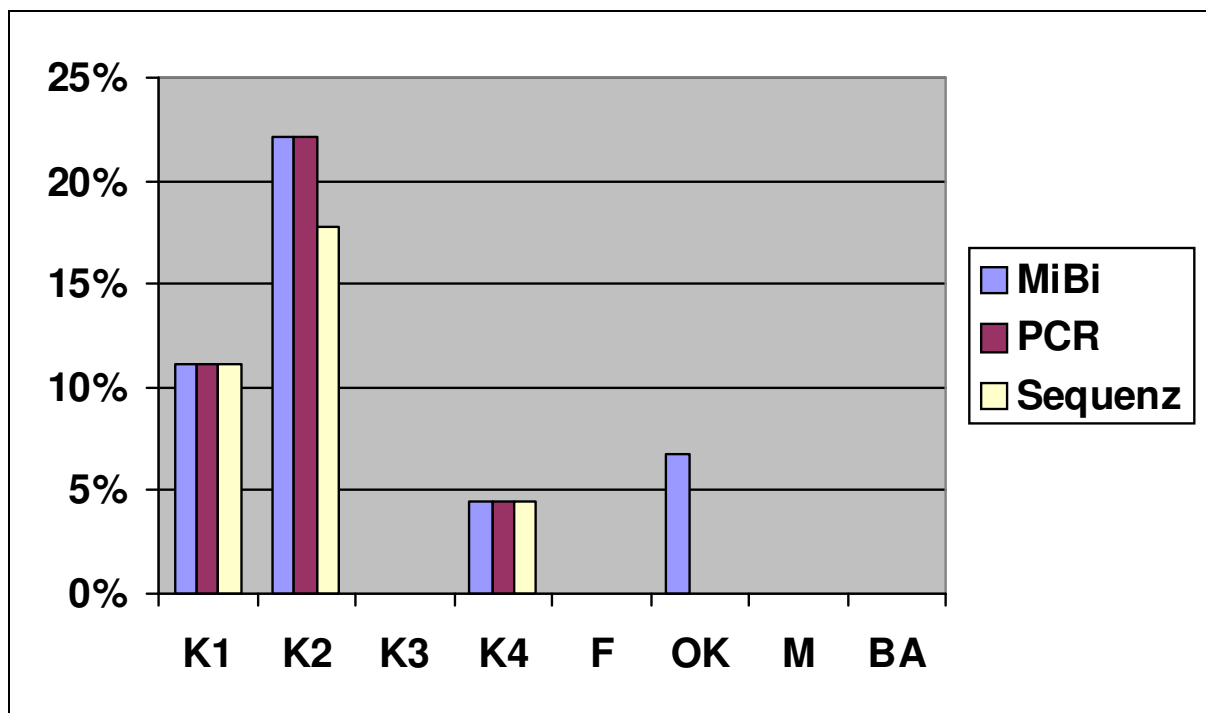
	K1	K2	K3	K4	F	OK	M	BA
<b>MiBi</b>	28,9 %	22,2 %	16,0 %	11,1 %	12,0 %	37,5 %	8,0 %	24,0 %
<b>PCR</b>	22,2 %	13,3 %	8,0 %	4,4 %	4,0 %	7,5 %	8,0 %	8,0 %
<b>Sequenz</b>	20,0 %	13,3 %	4,0 %	2,2 %	4,0 %	7,5 %	8,0 %	8,0 %



**Abb. 4:** Bildliche Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden; Legende siehe Tabelle 18.

#### 4.4.2 Vergleichende Darstellung der Nachweisrate von *Arcobacter* spp. über die quantitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden

Bei der vergleichenden Darstellung der über die quantitative Untersuchung gewonnenen Isolate an den einzelnen Schlachtstationen ist das Ergebnis zwischen den jeweiligen Untersuchungsmethoden nicht so unterschiedlich wie bei den qualitativ gewonnenen Isolaten. Bei den Karkassen nach dem Brühen und Entfedern blieb der Wert der *Arcobacter*-positiven Proben mit 11,1 % und der Wert bei den Karkassen nach der Kühlung mit 4,4 % unverändert. Das Untersuchungsergebnis nach der Gensequenzierung lag bei den Karkassen nach der Eviszierung um 4,4 Prozentpunkte niedriger als nach der PCR (Tab. 18). Bei den Geflügelteilstückproben konnte der nach der Mikrobiologischen Untersuchung mit 6,7 % *Arcobacter*-positiven Proben angegebene Wert nach der PCR nicht bestätigt werden.



**Abb. 5:** Vergleichende Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden; Legende siehe Tabelle 18.



Bei den restlichen Teilstückproben konnten über die quantitative Untersuchung keine *Arcobacter*- positiven Proben nachgewiesen werden.

**Tabelle 18:** Vergleichende Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszierung, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte; MiBi: Mikrobiologie; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion; Sequenz: Ergebnisse nach der Gen- Sequenzierung.

	<b>K1 (%)</b>	<b>K2 (%)</b>	<b>K3 (%)</b>	<b>K4 (%)</b>	<b>F (%)</b>	<b>OK (%)</b>	<b>M (%)</b>	<b>BA (%)</b>
<b>MiBi</b>	11,1	22,2	0,0	4,4	0,0	6,7	0,0	0,0
<b>PCR</b>	11,1	22,2	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Sequenz</b>	11,1	17,8	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0

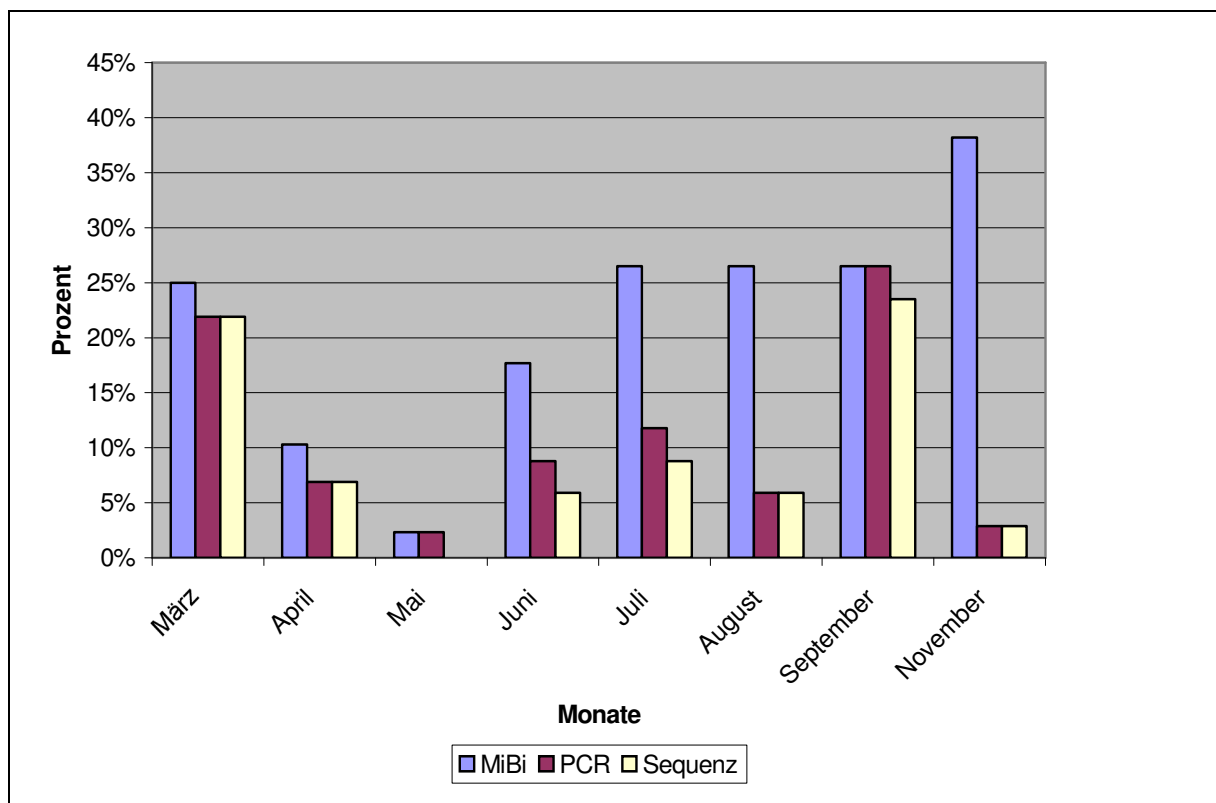
#### **4.5 Vergleichende Monatsdarstellung der qualitativ nachgewiesenen *Arcobacter*- positiven Proben nach den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren**

Die in Abbildung 6 und Tabelle 19 ausführlich dargestellten Ergebnisse zeigen die vergleichende Darstellung der erzielten Monatsresultate nach den jeweiligen Untersuchungsverfahren. Der Unterschied der prozentualen Nachweisraten zwischen den jeweiligen Verfahren wird deutlich. Im Monat März lag der *Arcobacter*- Nachweis nach der PCR- Untersuchung um 3,1 Prozentpunkte niedriger als nach der Mikrobiologischen Untersuchung. Dieser Wert bestätigte sich nach der Sequenzanalyse. Im September lag das Sequenzergebnis ebenfalls um 3 Prozentpunkte niedriger als die vorherigen Untersuchungen mit jeweils 26,5 % *Arcobacter*- positiven Isolaten. Im April lag der Nachweis 3,4 Prozentpunkte niedriger als nach der Mikrobiologischen Untersuchung. Im Mai konnten die 2,3 % *Arcobacter*- positiven Isolate nach den molekularbiologischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. In den Monaten Juni, Juli, August und November lag die Nachweisrate von *Arcobacter* spp. nach der Molekularbiologie deutlich unter der Nachweisrate der Mikrobiologie. Im Juni fiel das *Arcobacter*- positive Ergebnis von 17,7 % auf 5,9 %, im Juli

von 26,5 % auf 8,8 %, im August von 26,5 % auf 5,4 % und im November sogar von 38,2 % *Arcobacter*- positiven Proben nach der Mikrobiologie auf 2,9 % nach der Gensequenzierung.

**Tabelle 19:** Darstellung der qualitativ ermittelten *Arcobacter*- positiven Isolate der jeweiligen Untersuchungsmonate in Prozent nach der Mikrobiologischen Untersuchung, nach der PCR- Untersuchung und nach der Gensequenzierung.

	März (%)	April (%)	Mai (%)	Juni (%)	Juli (%)	August (%)	Sept. (%)	Nov. (%)
<b>MiBi</b>	25,0	10,3	2,3	17,7	26,5	26,5	26,5	38,2
<b>PCR</b>	21,9	6,9	2,3	8,8	11,8	5,9	26,5	2,9
<b>Sequenz</b>	21,9	6,9	0,0	5,9	8,8	5,9	23,5	2,9



**Abbildung 6:** Vergleichende Darstellung der *Arcobacter*- positiven Isolate nach der qualitativen Aufarbeitungsmethode in der Mikrobiologie, der PCR- Untersuchung und der Sequenzierung. X-Achse: % *Arcobacter*- positive Isolate; Y-Achse: Untersuchungsmonate

#### 4.6 Vergleichende Monatsdarstellung der Nachweisrate über die quantitative Untersuchung nachgewiesenen *Arcobacter*- positiven Proben nach den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren

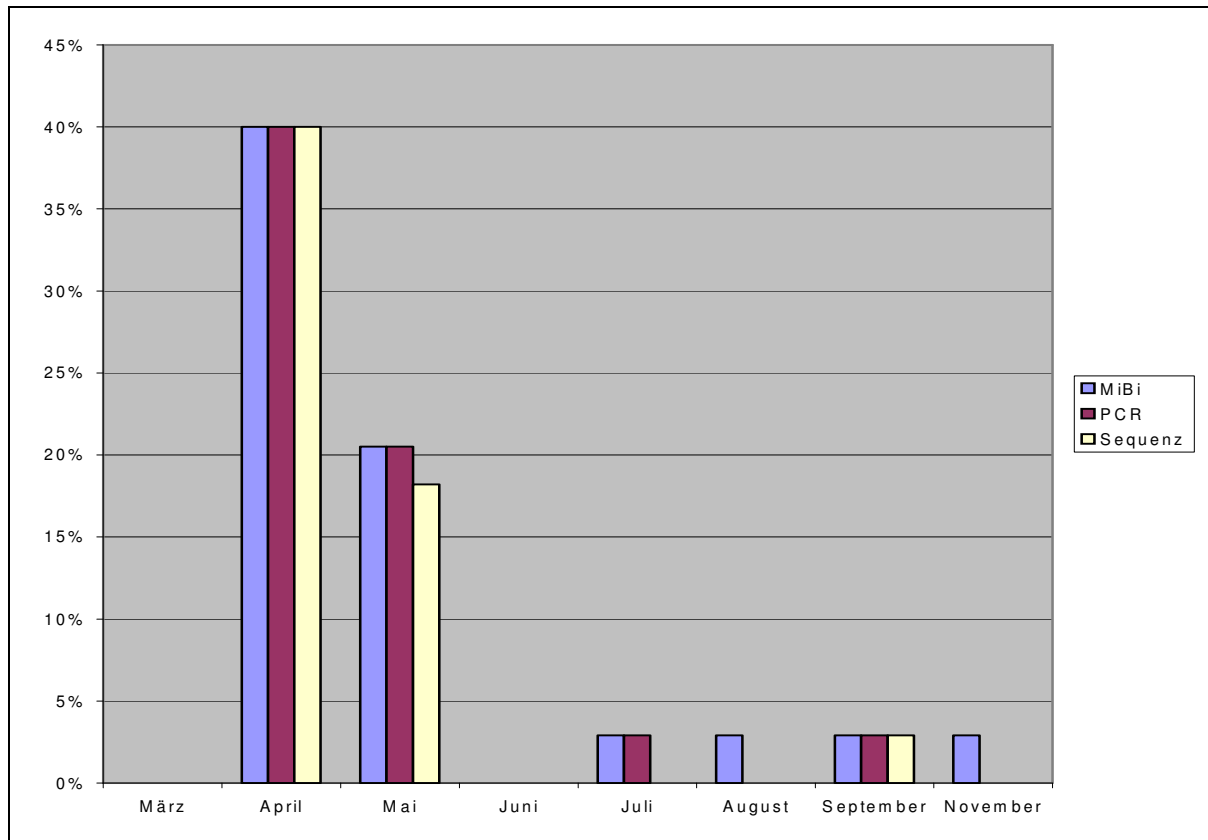
Die prozentualen Anteile der bei der quantitativen Untersuchung gewachsenen *Arcobacter*- positiven Proben sind in Tabelle 20 und in der Abbildung 7 dargestellt. Im Gegensatz zu den qualitativ gewonnenen Isolaten konnten in nicht allen Beprobungsmonaten *Arcobacter* nachgewiesen werden. In den Monaten März und Juni konnten in der Mikrobiologie keine Bakterien isoliert werden, die in das biochemische Profil von *Arcobacter* passen. In den Monaten Juli, August, September und November lag der prozentuale Anteil von *Arcobacter* bei 2,9 % der in der Mikrobiologie untersuchten Putenproben. Im Juli, August und November konnten am Ende der Gensequenzierung keine, und im September noch 2,9 % *Arcobacter*- positive Isolate nachgewiesen werden. Am stärksten waren die Aprilproben mit *Arcobacter* belastet.

**Tabelle 20:** Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung ermittelten *Arcobacter*- positiven Isolate der jeweiligen Untersuchungsmonate in Prozent nach der Mikrobiologischen Untersuchung, nach der PCR- Untersuchung und nach der Gensequenzierung.

	März (%)	April (%)	Mai (%)	Juni (%)	Juli (%)	August (%)	Sept. (%)	Nov. (%)
<b>MiBi</b>	0,0	40,0	20,5	0,0	2,9	2,9	2,9	2,9
<b>PCR</b>	0,0	40,0	20,5	0,0	2,9	0,0	2,9	0,0
<b>Sequenz</b>	0,0	40,0	18,2	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0

Im Gegensatz zu den anderen Monaten war das Ergebnis mit 40 % nach der PCR und der Gensequenzierung identisch mit dem Ergebnis nach der Mikrobiologischen Untersuchung. Die zweithöchste Kontamination wurde im Mai mit 20,5 % *Arcobacter*- positiven Proben

festgestellt. Jedoch verringerte sich das Ergebnis nach der Gensequenzierung um 2,3 Prozentpunkte auf insgesamt 18,2 % *Arcobacter*- positive Putenproben.

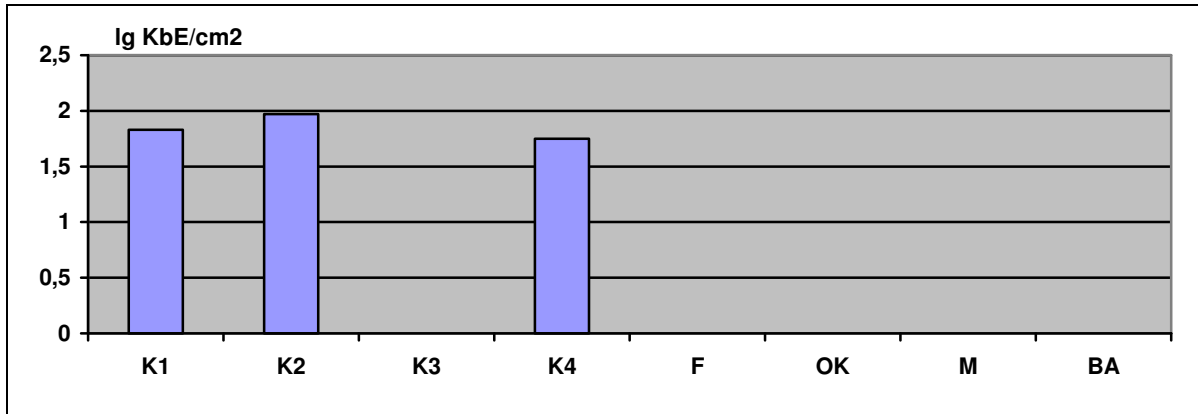


**Abbildung 7:** Vergleichende Darstellung der über die quantitative Untersuchung nachgewiesenen *Arcobacter*- positive Isolate in der Mikrobiologie, der PCR- Untersuchung und der Sequenzierung. X-Achse: *Arcobacter*- positive Isolate in %; Y-Achse: Untersuchungsmonate.

#### 4.7 Quantifizierung von *Arcobacter* spp.

Die Quantifizierung von *Arcobacter* spp. erfolgte schlachtprozessbegleitend an verschiedenen Stationen (Abb.8), die für das Ziel dieser Studie, einen Überblick über mögliche Eintragungsquellen von *Arcobacter* spp. zu erlangen, von großer Bedeutung waren. Für die

quantitativen Untersuchungen wurden wie bei den qualitativen Untersuchungen die selektiven mCCDA- Platten eingesetzt.



Probenart	K1	K2	K3	K4	F	OK	M	BA
Mittelwert	1,83	1,97	0	1,75	0	0	0	0

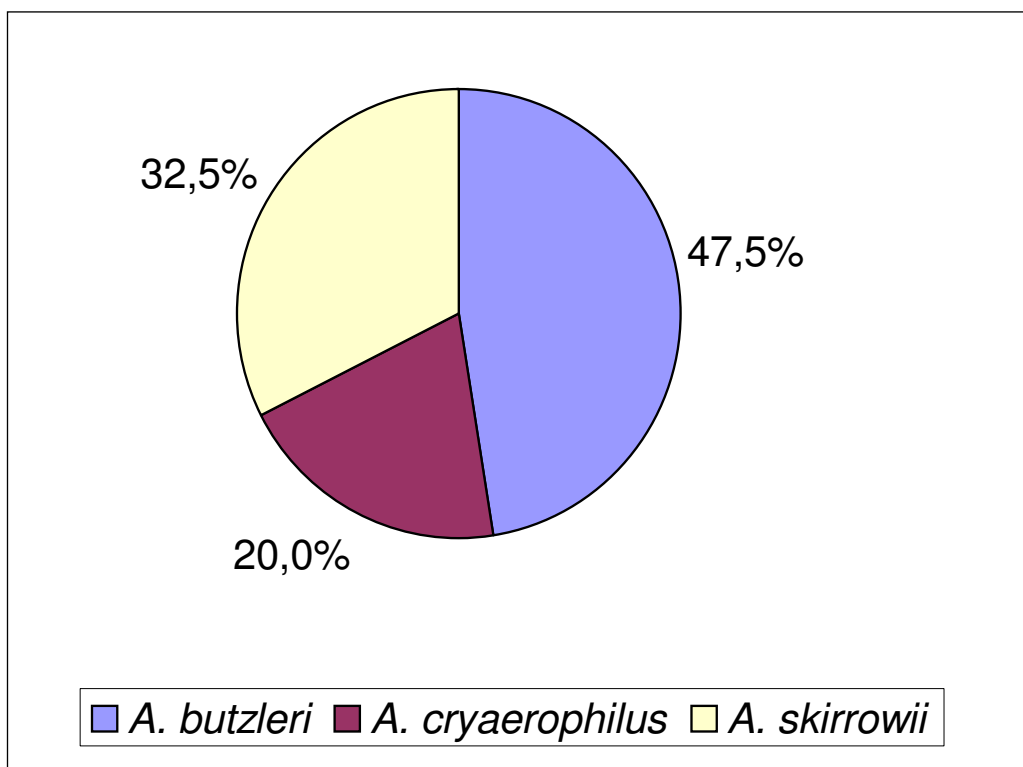
**Abbildung 8:** Darstellung des geometrischen Mittels der quantitativen Belastung der *Arcobacter*- positiven Isolate an den jeweiligen Stationen in lg KbE/cm<sup>2</sup> bei den Karkassen und KbE/g Fleisch bei den Teilstücken K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte.

Die Untersuchungsergebnisse wurden nach Probenart geordnet und die quantitative Belastung der *Arcobacter*- positiven Isolate als Mittelwert errechnet und als dekadischer Logarithmus der koloniebildenden Einheiten (Log<sub>10</sub> KbE/cm<sup>2</sup>) dargestellt. Für die Darstellung der Ergebnisse der *Arcobacter*- Keimzahlbestimmungen wurden die *Arcobacter*- negativen Proben nicht in die Bewertung einbezogen. Die Nachweisgrenze der Quantifizierung ergab sich aus den Verdünnungen bei der Probenaufarbeitung und lag demnach bei lg 1,3 KbE/cm<sup>2</sup>. Diese Werte sind in der Abbildung 8 aufgetragen. Die quantitative Belastung mit *Arcobacter* lag im Durchschnitt aller auswertbaren Proben bei lg 1,85 KbE/cm<sup>2</sup>. Dabei waren die Karkassen vor der Eviszeration mit lg 1,83 KbE/cm<sup>2</sup> belastet. Nach der Eviszeration stieg dieser Wert auf lg 1,97 KbE/cm<sup>2</sup> an. Bei den Karkassen vor der Kühlung konnten keine *Arcobacter* ohne einen vorherigen Anreicherungsschritt nachgewiesen werden. Nach der Kühlphase waren die Karkassen mit lg 1,75 KbE/cm<sup>2</sup> belastet. Aus den

Putenteilstücken konnten ebenfalls keine *Arcobacter* spp. ohne vorherige Anreicherung isoliert werden. Somit sind die Erreger auf den Teilstücken vorhanden, liegen aber unterhalb der Nachweisgrenze.

#### 4.8 Speziesdifferenzierung von *Arcobacter* aus den Putenproben

In den Untersuchungen der acht Putenherden im Rahmen der Schlachtung und Verarbeitung wurden mit Hilfe des qualitativen und des quantitativen Nachweisverfahrens insgesamt 40 *Arcobacter*- Isolate gewonnen. Das bedeutet, dass in 7,7 % der 519 Putenproben *Arcobacter* Spezies nachgewiesen werden konnten. Durch das qualitative Verfahren konnten 25 (62,5%) und über die quantitative Untersuchung 15 (37,5%) der 40 Isolate gewonnen werden. Wie in Abbildung 9 dargestellt ist, wurde *A. butzleri* mit 47,5 % (n=19) am häufigsten isoliert, gefolgt von *A. skirrowii* mit 32,5 % (n=13) und *A. cryaerophilus* mit 20 % (n=8).



**Abbildung 9:** Verteilung der *Arcobacter*- Spezies (%) nach der Gensequenzierung der 40 gewonnenen *Arcobacter*- Isolate.

Nach den biochemischen Reaktionen in der Mikrobiologie wurden 77 Isolate als *Arcobacter* angesprochen. Dies entspricht einem Anteil von 14,8 % der untersuchten Proben. Die anschließende PCR- Untersuchung ergab ein *Arcobacter*- positives Ergebnis von 8,7 % (n=45). Nach der Gensequenzierung waren noch 40 Proben *Arcobacter*- positiv. Somit konnte festgestellt werden, dass 5 Isolate, welche laut PCR- Untersuchung *Arcobacter*- positiv waren, sich nach der Gensequenzierung als *Arcobacter*- negativ herausstellten. Insgesamt haben sich 38 Isolate, welche in der Mikrobiologie noch als *Arcobacter* angesprochen wurden, durch die Gensequenzierung als *Arcobacter*- negativ herausgestellt. Eine ausführliche Übersicht dieser Isolate ist in Tabelle 21 dargestellt.

Mit 55,9 % wurden *Pseudomonas* spp. aufgrund der *Arcobacter*- negativen Sequenzen nachgewiesen, gefolgt von *Comamonas* spp. mit 17,7 % und *Delftia* spp. mit 14,7 %. *Acinetobacter* spp. wurden zu 8,8 % und *Ochrabactrum* spp. zu 2,9 % identifiziert (Abb. 10).

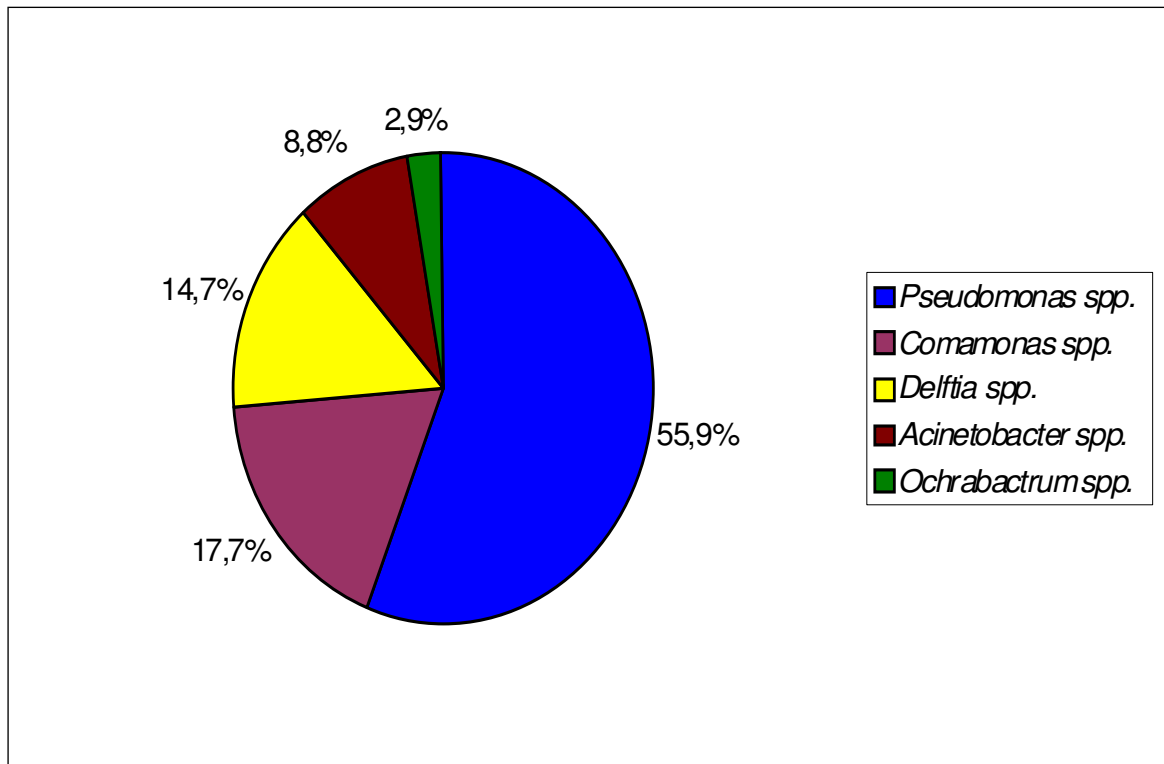
**Tabelle 21:** Übersicht der nach der Mikrobiologischen Untersuchung positiven *Arcobacter*- Isolate, welche sich nach der Sequenzierung als *Arcobacter*- negativ herausstellten. K1: Karkassen nach Brühen und Entfedern, K2: Karkassen nach der Eviszeration, K3: Karkassen vor der Kühlung, K4: Karkassen nach der Kühlung, F: Flügel, OK: Oberkeulen, M: Medaillons, BA: Brustabschnitte; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; ? positiv: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Positiven; ? negativ: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Negativen.

Monat	Probe	MiBi	PCR	Gensequenzierung
März	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
April	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
Mai	K 1	positiv	positiv	<i>Comamonas</i> spp.
Mai	K 1	positiv	positiv	<i>Comamonas</i> spp.
Juni	K 1	positiv	negativ	<i>Delftia</i> spp.
Juni	K 3	positiv	positiv	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juni	Flügel	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juni	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.

## Ergebnisse

Juli	K 2	positiv	positiv	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juli	K 2	positiv	? negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juli	K 4	positiv	? negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juli	K 4	positiv	positiv	<i>Comamonas</i> spp.
Juli	K 4	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
Juli	OK	positiv	? positiv	<i>Comamonas</i> spp.
Juli	OK	positiv	? positiv	<i>Comamonas</i> spp.
August	OK	positiv	negativ	<i>Delftia</i> spp.
August	K 1	positiv	negativ	<i>Comamonas</i> spp.
August	K 3	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
August	K 3	positiv	? positiv	<i>Acinetobacter</i> spp.
August	OK	positiv	negativ	<i>Delftia</i> spp.
August	OK	positiv	negativ	<i>Delftia</i> spp.
August	BA	positiv	negativ	<i>Delftia</i> spp.
August	BA	positiv	? negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
September	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
September	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	K 1	positiv	negativ	<i>Acinetobacter</i> spp.
November	K 1	positiv	negativ	<i>Acinetobacter</i> spp.
November	K 2	positiv	negativ	<i>Comamonas</i> spp.
November	K 2	positiv	negativ	<i>Comamonas</i> spp.
November	K 4	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	K 4	positiv	negativ	<i>Ochrabactrum</i> spp.
November	Flügel	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	BA	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.
November	BA	positiv	negativ	<i>Comamonas</i> spp.
November	OK	positiv	negativ	<i>Pseudomonas</i> spp.





**Abbildung. 10:** Prozentuale Übersicht der nach der Gensequenzierung *Arcobacter*- negativen Isolate; blau: *Pseudomonas* spp.; violett: *Comamonas* spp.; gelb: *Delftia* spp.; rot: *Acinetobacter* spp.; grün: *Ochrobactrum* spp.

## 5 Diskussion

*Arcobacter*- Infektionen haben in den letzten Jahren einen immer höher werdenden Stellenwert hinsichtlich der Verbrauchergesundheit bekommen. Im Jahre 2002 wurde *A. butzleri* als eine ernstzunehmende Gefahr für die menschliche Gesundheit durch die Internationale Kommission für die Mikrobiologische Spezifikation in Lebensmitteln (ICMSF, 2002) benannt.

Ein besonderes Augenmerk im Hinblick auf Erkrankungen des Menschen spielt dabei der Verzehr von Lebensmitteln. Verschiedene Studien haben die Kontamination mit *Arcobacter* Spezies in Proben von verschiedenen Tierarten bewiesen (HO et al., 2006). Die höchste Prävalenz wurde dabei im Geflügelfleisch, und hier vor allem in Broilerproben gefunden (RIVAS et al., 2004). Hinsichtlich der Belastung von Putenfleisch mit *Arcobacter* ist bisher noch sehr wenig bekannt. Als potenzielle Vektoren gelten unzureichend erhitztes Geflügelfleisch sowie Kreuzkontaminationen im häuslichen Umgang mit den rohen Geflügelprodukten (Lehner et al., 2005).

Um die bisher niedrige Erkrankungsrate nicht weiter ansteigen zu lassen bzw. sie zu stoppen ist die Aufklärung des Verbreitungsweges dieses Bakteriums von großer Bedeutung. Somit stellt die Forschung hinsichtlich der Epidemiologie von *Arcobacter* spp. einen wichtigen Baustein bezüglich der Verbrauchergesundheit dar.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Prävalenz von *Arcobacter* spp. prozessbegleitend während der Schlachtung und Zerlegung in den gesammelten Putenproben zu ermitteln. Des Weiteren sollte durch den Einsatz qualitativer und quantitativer Untersuchungsmethoden der Unterschied hinsichtlich der Nachweisbarkeit von *Arcobacter* spp. aufgezeigt werden. Zusätzlich sollte anhand der quantitativen Untersuchung die durchschnittliche Keimbelastung der Proben ermittelt werden, um weitere Anhaltspunkte hinsichtlich eines kritisch zu betrachtenden Grenzwertes von *Arcobacter* spp. zu erlangen. Ausserdem wurden alle nach der mikrobiologischen Untersuchung als *Arcobacter*- positiv eingestuften Isolate einer weiteren PCR- Untersuchung und einer sich anschließenden Gensequenzierung unterzogen, um die jeweilige Spezifität dieser Verfahren zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von acht Monaten Putenherden während der Schlachtung und der sich

anschließenden Zerlegung auf ihren jeweiligen *Arcobacter*- Status an den einzelnen Untersuchungsstationen untersucht.

### **5.1 Begründung der eingesetzten Methoden zur Isolierung, Quantifizierung und Differenzierung von *Arcobacter* spp.**

Zurzeit werden für den Nachweis von *Arcobacter* spp. aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs unterschiedliche Methoden eingesetzt, welche vielfach durch die Laboratoriumspraxis oder auch länderspezifisch geprägt sein können. Diese Aussage wird durch die verschiedenen zum Einsatz kommenden Anreicherungsmedien und Medien für den Direktausstrich deutlich. Um aber auf europäischer Ebene vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der *Arcobacter*- Prävalenzen im Geflügelfleisch (inkl. Putenfleisch) zu erzielen, ist es notwendig, dass standardisierte Nachweisverfahren in allen Mitgliedsstaaten eingesetzt werden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Ein Ansatz zur Standardisierung sind die Methoden nach ISO. Zum Zeitpunkt dieser Studie gab es für den Nachweis von *Arcobacter* spp. kein ISO-Untersuchungsverfahren.

Der Nachweis von *Arcobacter* sowie die Quantifizierung wurden in den eigenen Untersuchungen in Anlehnung an das Untersuchungsverfahren durchgeführt, welches ATABAY und CORRY (1998) in ihrer Studie angewendet haben. Bei diesem Verfahren wird ein vorheriger Anreicherungsschritt aufgrund einer möglichen geringen Kontamination oder aufgrund der durch den Verarbeitungsprozess möglicherweise geschädigten *Arcobacter* durchgeführt. Die gesammelten Proben wurden in *Arcobacter*- Bouillon (Oxoid) mit CAT-Supplement für 48 Stunden bei 25°C angereichert. Der Vorteil dieses *Arcobacter*- Mediums ist seine einfache und ökonomische Anwendung und seine Spezifität bezüglich des Wachstums von *Arcobacter* spp. Die Untersucher konnten ein gutes Wachstum aller drei *Arcobacter*- Spezies feststellen, welche im Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen oder von Tieren stehen (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*).

Um aber auch Anhaltspunkte über die Prävalenzen von Putenproben ohne vorherigen Anreicherungsschritt zu erhalten, wurden die gesammelten Proben ebenfalls einer quantitativen Untersuchung unterzogen. Bei diesem Verfahren wurden Verdünnungsreihen hergestellt, um die tatsächliche Keimbelastung der Karkassen bzw. der Geflügelteilstückproben feststellen zu können. Als Kultivierungsmedium wurden wie im

qualitativen Verfahren m-CCDA- Platten aufgrund ihrer Eigenschaft, Begleitkeime stark unterdrücken zu können, ausgewählt.

Alle gewonnenen Reinkulturen wurden daraufhin den für *Arcobacter*- Spezies zutreffenden biochemischen Reaktionen ausgesetzt. Stimmt alle Untersuchungsergebnisse mit den für *Arcobacter* typischen Reaktionen überein, wurden sie als *Arcobacter*- positiv angesehen. Aufgrund der Tatsache, dass man anhand dieser biochemischen Reaktionen die *Arcobacter*- Spezies nicht untereinander differenzieren kann, wurden alle *Arcobacter*- positiven Isolate mittels PCR näher bestimmt. Bei dieser Untersuchung wurde die multiplex- PCR (m-PCR) nach HOUF et al. (2000) angewendet. Dieses Verfahren zielt auf die 16S bzw. 23S rRNA- Gene für die gleichzeitige Identifikation von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirowii* ab. In ihren Versuchen verstärkte das angewendete Primer- Paar *ARCO* – *BUTZ* ein 401Bp- Fragment und stellte sich als spezifisch für alle getesteten *A. butzleri*- Stämme heraus. Mit den Primern *ARCO* – *SKIR* konnte für alle getesteten *A. skirowii*- Stämme ein spezifisches 641Bp- Fragment dargestellt werden. Für den Nachweis von *A. cryaerophilus* wurden die Primer *CRY1* und *CRY2* verwendet. Diese Kombination amplifizierte ein spezifisches 257Bp- Fragment bei allen getesteten *A. cryaerophilus*- Subtyp1 oder – Subtyp2- Stämmen. Somit kamen die Autoren zu dem Schluss, dass diese Spezies- spezifische m-PCR eine schnelle Nachweismethode von *Arcobacter*- Spezies im Geflügelfleisch sei.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von HOUF et al. (2000) konnte in dieser Studie mit Hilfe der m-PCR mit den oben angegebenen Primern in nicht allen Fällen eine eindeutige Zuordnung zu einer *Arcobacter*- Spezies getroffen werden. Als größtes Problem stellte sich dabei die Ähnlichkeit der Primer für *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* heraus. Somit konnte anhand der visuell sichtbaren Banden nach der Gelelektrophorese nicht immer eine exakte Spezieseinteilung vorgenommen werden.

Interessanterweise gab es einen signifikanten Unterschied in den Ergebnissen nach der mikrobiologischen Untersuchung und nach der PCR. Waren nach dem mikrobiologischen Nachweis noch insgesamt 77 Isolate *Arcobacter*- positiv, reduzierte sich diese Anzahl nach der m-PCR auf 45 *Arcobacter*- positive Isolate. Dies stellt einen prozentualen Rückgang von 41,6 % dar.

Weil nach der PCR nicht alle Isolate zweifelsfrei einer *Arcobacter*- Spezies zugeordnet werden konnten, wurden alle Isolate, die nach der mikrobiologischen Untersuchung als

*Arcobacter*- positiv eingestuft wurden einer Gensequenzierung unterzogen. Ziel dieser Untersuchung war es, anhand der genspezifischen Nukleotidsequenzen die Isolate eindeutig einer *Arcobacter* Spezies zuordnen zu können.

Im Gegensatz zu den PCR- Ergebnissen mit 45 positiven Isolaten, waren nach der Gensequenzierung noch 40 Isolate *Arcobacter*- positiv. Somit konnten wir in unseren Untersuchungen feststellen, dass die PCR mit den oben genannten Primern eine Fehlerquote von 11,1 % hatte. Durch die Auswertung mit dem Kappilarsequenzierer Ceq 8000 und der dazugehörigen Software konnten letztendlich 19 Isolate *A. butzleri* (47,5%), 13 Isolate *A. skirrowii* (32,5%) und 8 Isolate *A. cryaerophilus* (20%) differenziert werden.

### 5.2 Auswahl der Probeentnahmestationen

Die Untersuchung auf *Arcobacter* spp. in der Putenschlachtung beinhalteten die Karkassen nach dem Brühen und Entfedern, nach der Eviszeration, vor der Kühlung und nach der Kühlung. Auswahlkriterien für diese Probeentnahmestellen waren zum einen, Änderungen der Prävalenz und der Keimzahl bedingt durch die jeweiligen Prozessschritte feststellen zu können, aber auch eine Aussage über mögliche Kreuzkontaminationen machen zu können. (REICH, 2007). Aus diesem Grund wurden die Proben frühestens eine Stunde nach Schlachtbeginn aus repräsentativen Herden entnommen. Die Beprobung von Karkasen unmittelbar nach der Tötung der Tiere und vor dem Brühen und der Entfederung war nicht möglich, da der Aufbau der Schlachthanlage eine Probenahme an dieser Stelle unmöglich machte. Die erste Probe wurde unmittelbar nach dem Brühen und Entfedern beim Übertritt vom unsauberen in der sauberen „weißen“ Bereich genommen. Untersuchungsziel an dieser Station war es, die Prävalenz von *Arcobacter* spp. beim Eintritt in die eigentliche Schlachthalle herauszufinden. Als nächster Bearbeitungsschritt während des Schlachtprozesses wurden die Tiere eviszeriert. Während dieses Schrittes kann es zu Verschmutzungen der Karkassen mit Fäzes aus zerrissenen Därmen kommen. Da es unterschiedliche Meinungen über das natürliche Vorkommen von *Arcobacter* spp. im Magen-Darm- Trakt von Geflügel gibt, wurden die Karkassen nach der Eviszeration beprobt, um eine Aussage über eine mögliche Kontamination der Tierkörper mit *Arcobacter* über den Magen-Darm- Inhalt treffen zu können. Nach der Eviszeration wird die Geflügelfleischkontrolle durch amtliche Fachassistenten durchgeführt. Anschließend werden noch die verzehrfähigen

Organe wie z.B. Herz, Leber und Muskelmagen gewonnen und die Tierkörper im Karkassentrimmer von aussen und innen gewaschen. Um einen evtl. Eintrag von *Arcobacter* über das Wasser in den Schlachtprozess festzustellen wurden die Karkassen am Ende der Schlachtkette vor dem Verbringen in die Kühlräume beprobt. Der Einfluss der Kühlung auf die *Arcobacter*- Belastung wird unterschiedlich diskutiert. Vor allem die Wirkung der Luftkühlung auf die nicht- thermophilen *Arcobacter* ist umstritten, da bisher eine unzureichende Datenlage zu diesem Streitpunkt vorliegt. Aus diesem Grunde wurde die letzte Karkassenprobe im Anschluss an die Kühlungsphase genommen.

Die anschließende Beprobung der Geflügelteilstücke sollte einen Überblick über die *Arcobacter*- Belastung der verpackungsfertigen Endprodukte geben.

### **5.3 *Arcobacter*- Spezies in der Putenschlachtung**

In der durch das BfR veröffentlichten Studie von BARTHOLOMÄ und NAUMANN (2006) wurde die Belastung von Geflügelteilstücken verschiedener Geflügelarten untersucht. Der Anteil von Putenproben war mit 1 von 82 Geflügelproben sehr gering. Dabei konnten in 85,4 % der Proben *Arcobacter* nachgewiesen werden. *A. butzleri* war in 40,2 % der Fälle nachzuweisen, gefolgt von *A. cryaerophilus* mit 3,7 %. *A. skirrowii* konnte nicht aus den Proben isoliert werden. In 41,5 % der positiven Proben konnte bei der Untersuchung eine Mehrfachbesiedlung von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* festgestellt werden. In der eigenen Untersuchung konnte nur auf einer Karkasse vor der Eviszeration der Aprilproben eine Mischbesiedlung von *A. butzleri* und *A. skirrowii* festgestellt werden. Dies entspricht einem Anteil von 2,5 %.

In der Studie von STINY et al. (2006) wurden ebenfalls Fleisch und Fleischerzeugnisse verschiedener Geflügelarten auf das Vorkommen von *Arcobacter* untersucht. Dabei entfiel mit 14 Proben lediglich eine geringe Probenanzahl auf Putenfleisch. Von insgesamt 209 untersuchten Proben waren 79 *Arcobacter*- positiv (37,8%). In 70 Proben wurden *A. butzleri*, in 12 Proben *A. cryaerophilus* und in 6 Proben *A. skirrowii* identifiziert. Über die Verteilung von Mehrfachkontaminationen und die genaue Speziesverteilung innerhalb der Putenproben wird in der Veröffentlichung nicht berichtet. Im Rahmen dieser Studie wurden 275 Proben qualitativ und 244 Proben quantitativ auf das Vorhandensein von *Arcobacter* spp. untersucht. Insgesamt wurden in 7,7 % der 519 Putenproben *Arcobacter* nachgewiesen. Durch die

qualitative Untersuchung konnten 62,5 % und durch die quantitative Untersuchung 37,5 % der *Arcobacter*- positiven Proben isoliert werden.

In der Untersuchung von MANKE et al. (1998) aus den USA waren 303 von 395 mechanisch zerkleinerten Putenproben positiv für *Arcobacter* spp. Davon konnten in 223 Proben (74%) *A. butzleri* nachgewiesen werden. Über die weitere Verteilung der jeweiligen Spezies machen die Autoren keine näheren Angaben. 1996 berichteten MANKE et al. über 80 % *A. butzleri*-positive Proben in einer Winterbeprobung. Während einer Sommerbeprobung von Putenfleisch konnten in 83% der Proben *A. butzleri* festgestellt werden. In den eigenen Untersuchungen konnten im Hinblick auf saisonale Besonderheiten keine signifikanten Erkenntnisse gewonnen werden.

In einer weiteren amerikanischen Studie von ANDERSEN et al. (2007) wird über eine *Arcobacter*- Belastung von Putenkarkassen berichtet. In 94 % der Proben wurden *Arcobacter* spp. nachgewiesen. Davon waren 22 % *A. butzleri* und 72 % nicht- *butzleri*- Stämme.

AYDIN et al. (2007) untersuchten in der Türkei insgesamt 806 Proben verschiedener Herkunft auf das Vorhandensein von *Arcobacter*. Davon entfielen 100 Proben auf Putenfleisch, in denen zu 4% *A. butzleri* nachgewiesen werden konnte. *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* wurden in den Putenproben nicht nachgewiesen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in den eigenen Untersuchungen *A. skirrowii* mit 32,5 % und *A. cryaerophilus* mit 20 % nachgewiesen.

Um die eigenen Ergebnisse mit anderen vergleichen zu können, fehlt es momentan an weiteren Auswertungen, die speziell auf die *Arcobacter*- Belastung im Putenfleisch ausgerichtet sind. Im Vergleich zu den drei amerikanischen Studien liegen die Ergebnisse dieser Untersuchung mit 47,5 % *A. butzleri*- positiven Proben in der Mitte der zu vergleichenden Prozentzahlen. Um die Kontamination von *A. skirrowii* und *A. cryaerophilus* einordnen zu können, fehlt es an vergleichenden Untersuchungsergebnissen.

#### **5.4 Prävalenz bzw. Quantifizierung von *Arcobacter* in der Putenschlachtung und -verarbeitung**

Die Infektionsdosis von *Arcobacter* für den Menschen ist bisher noch unklar und die Ergebnisse dieser quantitativen Untersuchung weisen im Durchschnitt eine relativ niedrige *Arcobacter*-Belastung auf ( $\lg 1,85 \text{ KbE/cm}^2$ ). Trotzdem können *Arcobacter* spp. nicht als Auslöser von Erkrankungen ausgeschlossen werden.

Die Keimzahlbestimmung von Karkassen nach dem Brühen und Entfedern ergaben *Arcobacter*-Zahlen von  $\lg 1,83 \text{ KbE/cm}^2$ . Dieser initiale Wert nach Eintritt in den Weißen-Bereich der Schlachthanlage stieg nach der Eviszeration auf  $\lg 1,97 \text{ KbE/cm}^2$ . Diese geringgradige Erhöhung der *Arcobacter*-Belastung lässt sich nicht mit einer Kontamination der Karkassen durch die eigentliche Eviszeration der Tiere, wie es bei der Kontamination mit *Campylobacter* spp. der Fall ist, erklären. Dabei werden die Karkassen mit Fäzes verschmutzt und die Keimbelastung der Karkassen nach der Eviszeration ist wesentlich höher als vor der Eviszeration (BAKER et al., 1987). In aktuelleren Untersuchungen konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden. REICH (2007) konnte eine Reduktion der *Arcobacter*-Belastung bei den Karkassen nach der Eviszeration feststellen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden anhand der verschiedenen Eviszerationsmethoden begründet. Bei den Untersuchungen von BAKER wurden die Tiere manuell ausgenommen und die Darmpakete zur Beschau über den Rücken der Karkassen gelegt. Heutzutage werden die Tiere mittels moderner Eviszerationsgeräte ausgenommen und das Magen-Darm-Konvolut auf separaten Haken begutachtet. Im Rahmen seiner Untersuchungen konnte REICH (2007) im Verlauf der Schlachtkette eine signifikante Reduktion der *Campylobacter*-Belastung von  $\lg 0,7$  feststellen. Des Weiteren gelten *Arcobacter* spp. nicht als natürlicher Darmbewohner von Geflügel (ATABAY und CORRY, 1997; EIFERT et al., 2003; HO et al., 2006), was eine Übertragung vom Darmtrakt auf die Karkassen unwahrscheinlich macht. Diese Aussage wird durch diese Studie bekräftigt.

Im weiteren Verlauf des automatisierten Schlachtprozesses konnten in den Proben vor der Kühlung keine *Arcobacter* spp. mehr nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnten die sich immer wiederholenden Waschschriffe zwischen der Eviszeration und dem Ende des Karkassenbandes sein. Dabei werden die Tiere immer wieder von aussen und innen mit frischem Wasser gereinigt. Obwohl viel über die Belastung von



Wasser und Wasserleitungen mit *Arcobacter* spp. veröffentlicht wurde (GONZALEZ et al., 2007; DONACHIE et al., 2005; ASSANTA et al., 2002), konnte an diesem Probenahmepunkt kein Eintrag des Bakteriums auf die Karkassen beobachtet werden. Eine weitere Erklärung könnte in der niedrigeren Probenzahl an dieser Schlachtstation liegen. Im Gegensatz zu den Proben nach der Kühlung, wo 45 Proben untersucht worden sind, wurden vor der Kühlung nur 25 Proben quantitativ auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. hin untersucht.

Der sich anschließende Kühlprozess dient der Fleischreifung. Zusätzlich soll die Keimbelastung besonders durch den austrocknenden Effekt der Luftkühlung reduziert werden (OTTH et al., 2001). In den eigenen Untersuchungen konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden, da die Karkassen nach der Kühlung wiederum mit *Arcobacter* kontaminiert waren. Im Durchschnitt lag die Belastung mit  $\lg 1,75 \text{ KbE/cm}^2$  niedriger als die Keimzahlkonzentration am Anfang der Schlachtkette. Da *Arcobacter* in der Lage sind bei niedrigeren Temperaturen zu wachsen, könnte das Kühlhaus als ein mögliches Kontaminationsrisiko angesehen werden. VAN DRIESSCHE und HOUF (2008) konnten in ihren Untersuchungen ein Überleben von *Arcobacter* spp. in Trinkwasser bei 4°C und bei 7°C feststellen. Durch unsere Untersuchungen wird ein Überleben dieses Bakteriums in den Kühlräumen bei 4°C bestätigt. Da man von einem keimreduzierenden Klima in den Kühlzellen ausgeht, werden diese nur selten gründlich gereinigt und desinfiziert, was im Zusammenhang mit den nicht-thermophilen *Arcobacter* neu überdacht werden sollte.

Insgesamt konnte in dieser Studie eine Reduktion der *Arcobacter*-Zahl im Verlauf der Schlachtkette festgestellt werden. Zu Beginn der Untersuchung wurde bei den Karkassen vor der Eviszeration eine durchschnittliche Keimbelastung von  $\lg 1,83 \text{ KbE/cm}^2$  nachgewiesen. An der letzten Untersuchungsstation waren die Karkassen mit durchschnittlich  $\lg 1,75 \text{ KbE/cm}^2$  kontaminiert. Diese Reduktion der *Arcobacter*-Belastung ist nicht signifikant. Bei den Teilstücken in der Verarbeitung konnten mit dem quantitativen Verfahren keine *Arcobacter* Spezies nachgewiesen werden, was für eine gute Arbeitshygiene und angemessene Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen der Arbeitsgeräte während der Zerlegung spricht. HOUF et al. (2003) nahmen Proben von der Oberfläche der Schlachtausrüstung. Dabei wurden *Arcobacter* spp. in 85 % der Tupferproben vor dem Schlachten und nach einer mehrtägigen Schlachtunterbrechung nachgewiesen. Ähnliche

Ergebnisse erhielten HOUF et al. (2002), als sie herausfanden, dass die *Arcobacter* – Kontamination im Schlachtequipment zum Ende der Arbeitswoche höher war, als zu Beginn der Woche. Die Untersucher kamen zu dem Schluss, dass *Arcobacter* spp. in der Lage sind, sich aufgrund unzureichender Dekontaminationsmaßnahmen in der Schlachtausrüstung zu akkumulieren und so zu der Verbreitung des Erregers auf die Geflügelfleischprodukte beitragen.

Um die Gefahr der Kontamination der für den Verzehr bestimmten Lebensmittel weiter zu senken, sind weitere Reduktionsmaßnahmen sinnvoll. Dabei sollte nicht nur der Schlacht- und Zerlegeprozess weiterhin kritisch untersucht werden, sondern auch die vorgelagerten Eintragungsmöglichkeiten wie z.B. die Aufzucht und der Transport der Tiere mit berücksichtigt werden. Des Weiteren stellt eine gute Hygienepraxis mit einer angemessenen Reinigung und Desinfektion der Arbeits- und Schlachtutensilien, eine weitere Reduktionsmaßnahme dar. Zusätzlich ist eine bessere Aufklärung der Verbraucher bezüglich der Kreuzkontamination von Lebensmitteln durch rohe Geflügelfleischprodukte angebracht.

Insgesamt wurde in unserer Untersuchung eine sehr geringe quantitative Belastung der Putenproben festgestellt. Um diese Ergebnisse einordnen zu können, fehlen vergleichbare Studien im Bereich der Putenschlachtung. Im Hinblick auf die Verbrauchergesundheit bleibt festzuhalten, dass bei den verpackungsfertigen Teilstücke, welche unmittelbar in den Einzelhandel gelangen, in dieser Studie keiner *Arcobacter*- Kontamination nachgewiesen werden konnten.

### **5.5 Ausblick**

Durch die verbesserten Nachweismethoden konnten *Arcobacter* spp. als potenziell neu auftommender humanpathogener Erreger erkannt werden (HOUF et al., 2005). Das bisherige Auftreten von *Arcobacter* in vielen Lebensmitteln tierischen Ursprungs rechtfertigt die Entwicklung von effektiven und standardisierten Nachweis- und Schutzmaßnahmen (HOUF et al., 2005). Bezüglich Durchfallerkrankungen des Menschen ist ein prophylaktisches Handeln ratsam.

Um die Gefahr einer Erkrankung durch *Arcobacter* zu senken und um den Eintrag in Viehbestände, Wasser und Lebensmittel zu reduzieren, sind standardisierte *Arcobacter*-Typisierungs- Methoden unerlässlich. Ziel sollte es sein, *Arcobacter*- Stämme aus

menschlichen Stuhlproben, Viehbeständen und Abortmaterial zu typisieren und weltweit zu vergleichen.

Im Gegensatz zu *C. jejuni* ist bisher wenig darüber bekannt, welche Gene bei der Kolonisation involviert sind und welche Virulenzmechanismen während der Besiedlung von Tieren und Menschen durch *Arcobacter* wirken. Obwohl viele dieser Virulenz-Charakteristika ähnlich denen von *C. jejuni* erscheinen, z.B. die Anhaftung (SNELLING et al., 2005), sind weitere Untersuchungen angebracht.

Zusätzlich werden weitere Studien zur Antibiotikaresistenz benötigt. In diesem Zusammenhang sollte abgeklärt werden ob die Gene, die für die Antibiotika-Resistenzen verantwortlich sind, auf andere *Arcobacter* Spezies oder sogar auf *Campylobacter* spp. transferiert werden können.

Laut BfR bedarf es weiterer Untersuchungen, ob und in welchem Maße *Arcobacter* spp. eine Gesundheitsgefährdung darstellt. Allerdings hält sie die Umsetzung der allgemein gültigen Regeln der Lebensmittel- und Küchenhygiene beim Umgang mit Lebensmitteln sowie eine sorgsame Arbeitsweise bei der Gewinnung, Verarbeitung und Distribution von Lebensmitteln und die Entwicklung standardisierter Untersuchungsmethoden für *Arcobacter* spp. für notwendig (Stellungnahme BfR Nr. 046/2007).

## 6 Schlussfolgerungen

Die *Arcobacter*- Prävalenz der untersuchten Herden lag bei 100 % und war damit hoch.

Im Verlauf der Schlachtung und Verarbeitung kam es zu einer Reduktion der Prävalenz von *Arcobacter* spp. auf den Schlachtkörpern und zu einer Reduzierung der Keimzahl.

Ein Vergleich der *Arcobacter*- Zahl auf den Karkassen beim Eintritt in den Weißen Bereich der Schlachthalle (nach dem Brühen und Entfedern) mit Karkassen zum Ende des Karkassenbandes (vor der Kühlung) ergab eine Keimzahlreduktion von  $\lg 0,14 \text{ KbE/cm}^2$ .

Bei den Putenteilstückproben konnten ohne vorherigen Anreicherungsschritt keine *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Somit liegt die Keimbelastung der Proben, die direkt in den Handel gelangen, unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei der Differenzierung der *Arcobacter*- Isolate konnte festgestellt werden, dass *A. butzleri* bei den Putenproben mit 47,5 % dominierend ist. Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen ist der prozentuale Anteil von *A. skirrowii* (32,5%) höher als der von *A. cryaerophilus* (20%).

Der Einsatz kombinierter Methoden zur Identifizierung von *Arcobacter*, hat in dieser Studie zu einer sicheren Aussagekraft der Prävalenzen an den einzelnen Schlachtstationen geführt.

Der alleinige *Arcobacter*- Nachweis anhand mikrobiologischer Eigenschaften lässt keine exakte Speziesdifferenzierung zu. Der Einsatz verschiedener Nachweisverfahren senkt die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen.

## 7 Zusammenfassung

Volker Kessen

### **Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Arcobacter* spp. in der Putenschlachtung**

*Arcobacter* spp. wurden in der letzten Zeit als potenziell neue humanpathogene Erreger anerkannt. Eine vorrangige Quelle für Erkrankungen des Menschen stellt Geflügelfleisch dar. Bisweilen gibt es nur wenige Daten über die Prävalenz von *Arcobacter* im Geflügel- und hier vor allem im Putenfleisch. Die genaue Infektionsdosis ist zur Zeit nicht bekannt, so dass möglicherweise bereits eine geringe Anzahl dieser Bakterien eine Erkrankung des Menschen hervorrufen könnte. Diesbezüglich stellt eine mangelhafte Küchenhygiene, in deren Folge es zu Kreuzkontaminationen von roh zu verzehrenden Lebensmitteln kommt, die größte Übertragungsgefahr dar. Ebenso wird ungenügend erhitztes Geflügelfleisch als eine mögliche Ansteckungsquelle angesehen.

In dieser Studie wurden über einen Zeitraum von acht Monaten Putenproben qualitativ und quantitativ auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden, Veränderungen der Prävalenz von *Arcobacter* spp. im Schlachtprozess nachzuweisen. Hierzu wurden monatlich Proben von Putenherden an verschiedenen Stationen der Schlachtung und Verarbeitung entnommen. Beprobte wurden dabei die Karkassen nach dem Brühen und der Entfederung, nach der Eviszeration, vor der Kühlung und nach der Kühlung. Die anschließende Beprobung der Putenteilstücke geschah mit dem Ziel, Erkenntnisse über der *Arcobacter*- Belastung der verpackungsfertigen Endprodukte zu bekommen.

Die Kombination verschiedener Nachweisverfahren erhöhte die Sicherheit bei der Analyse von *Arcobacter* an den unterschiedlichen Probeentnahmestationen. Der Einsatz von biochemischen Reaktionen, einer PCR Untersuchung und einer Gensequenzierung erwies sich als angebracht, da nach der Gensequenzierung wesentlich weniger Isolate dem Genus *Arcobacter* zugeordnet werden konnten, als nach den mikrobiologischen Untersuchungen ursprünglich angenommen wurde.

Die Prävalenzuntersuchungen ergaben, dass an allen Beprobungstagen *Arcobacter* spp. auf den Putenproben nachgewiesen werden konnten. Die Resultate der Proben aus der

Schlachtung zeigten, dass eine geringgradige Reduktion der *Arcobacter*- Belastung im Prozessverlauf stattfand. Am Anfang der Schlachtkette im reinen Bereich lag die Belastung der Karkassen nach dem Brühen und Entfedern bei  $\lg 1,83 \text{ KbE/cm}^2$ . Nach der Kühlung reduzierte sich die durchschnittliche Keimbelastung auf  $\lg 1,75 \text{ KbE/cm}^2$ . Die Reduktion der Oberflächenbelastung betrug somit lediglich  $\lg 0,08 \text{ KbE/cm}^2$ . Bei den Proben aus der Zerlegung wurden ohne einen vorherigen Anreicherungs-schritt keine *Arcobacter* spp. nachgewiesen.

Die Differenzierung der *Arcobacter*- Isolate zeigte, dass *A. butzleri* die am häufigsten isolierte Spezies war (47,5%), gefolgt von *A. skirrowii* (32,5%) und *A. cryaerophilus* (20%).

Um das Potenzial von *Arcobacter* spp. als gesundheitsgefährdendes Bakterium weiter einschätzen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Virulenz und der Antibiotika- Resistenzlage des Erregers. Zu diesem Zweck sollte ein international standardisiertes Nachweis- und Isolationsverfahren festgelegt werden. Beim Umgang mit rohem Putenfleisch gelten die allgemeinen Regeln der Lebensmittel- und Küchenhygiene.

## 8 Summary

Volker Kessen

### **Qualitative and quantitative analysis of *Arcobacter* spp. in turkey slaughtering**

*Arcobacter* spp. has been recently recognised as a potentially new human pathogen. Poultry is considered an important source of human illness. Up to now only few data exist on the prevalence of *Arcobacter* in poultry and in this case in turkey meat. The exact infection dose is unknown at present, so that probably already a small number of these bacteria could cause human illness. In this connection poor kitchen hygiene resulting in cross-contamination of raw to ready-to-eat foods poses the greatest risk of transmission. Likewise, insufficiently heated poultry is seen as a possible source of infection.

In this study turkey samples were examined qualitatively and quantitatively for the prevalence of *Arcobacter* spp. over a period of eight months. The aim of these investigations was to analyse the prevalence of *Arcobacter* spp. in the slaughter process by means of microbiological and molecular biological methods. Monthly samples were taken at various stages of slaughtering and processing. Samples were taken from the carcasses after scalding and plucking, after evisceration, before and after cooling. Afterwards, the partially cut turkeys were examined with the aim of confirming the prevalence of *Arcobacter* spp. in the end products ready for packaging.

Various confirmation procedures were used to be able to determine with high certainty the prevalence of *Arcobacter* spp. at the different stages of sampling. The use of biochemical reactions served to differentiate the *Arcobacter* spp. from other bacteria. The following analysis using molecular methods (PCR and gene sequencing) produced good results in classifying the isolate as belonging to the genus *Arcobacter*. In the evaluation of microbiological investigation alone, the detection rate of *Arcobacter* spp. was higher than after the molecular biological investigations. By means of gene sequencing some *Arcobacter*-suspected isolates could be classified as another type of bacteria. These results lead to the conclusion that confirmation of *Arcobacter* spp. should be carried out with more than one method.

The investigations for the prevalence of *Arcobacter* spp. showed that on all days of sampling and in all examined flocks *Arcobacter* could be detected. The results from the slaughtering demonstrated that a negligible reduction in *Arcobacter*-contamination took place in the course of the process. At the beginning of the slaughter chain the contamination level of the carcasses after scalding and plucking was lg 1.83 cfu/cm<sup>2</sup>. After cooling the average bacterial contamination decreased to lg 1.75 cfu/cm<sup>2</sup>. The reduction of the surface contamination was only lg 0,08 cfu/cm<sup>2</sup>. In the case of the investigated samples from cut turkey meat no *Arcobacter* could be detected.

The differentiation of *Arcobacter*-suspected isolates showed *A. butzleri* as the most frequently isolated species (47.5%), followed by *A. skirrowii* (32.5%) and *A. cryaerophilus* (20%).

To clarify the significance of *Arcobacter* spp. as a health risk for humans further investigations are necessary. In this case the virulence and the antibiotic resistance status of the pathogen should be examined more closely. Furthermore, the confirmation procedures and the differentiation methods of *Arcobacter* spp. have to be standardised.

This study demonstrates that turkey meat is contaminated with *Arcobacter* spp. at low rates but to avoid human illness good slaughter and kitchen hygiene practises are necessary.



## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Biochemische Kriterien zur Identifizierung von <i>Arcobacter</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. und <i>Bacillus ureolyticus</i> (VANDAMME, 2000). .....	19
<b>Tabelle 2:</b> Tabellarische Übersicht der qualitativ und quantitativ untersuchten Proben an den jeweiligen Stationen pro Monat.....	43
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der verwendeten Primer bei der PCR und ihre jeweiligen Basen- Sequenzen.....	49
<b>Tabelle 4:</b> Protokoll zur Herstellung eines 20 µl DTCS-Reaktionsansatzes.....	51
<b>Tabelle 5:</b> Verteilung der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der Mikrobiologischen Untersuchung im Jahresverlauf.....	59
<b>Tabelle 6:</b> Verteilung der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der PCR- Untersuchung im Jahresverlauf.....	60
<b>Tabelle 7:</b> Verteilung der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben aus der qualitativen Untersuchung mit Anreicherung nach der Sequenzierung im Jahresverlauf im Jahresverlauf.....	61
<b>Tabelle 8:</b> Nachweisrate der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach der Mikrobiologischen Untersuchung im Jahresverlauf.....	62

<b>Tabelle 9:</b> Nachweisrate der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach der PCR- Untersuchung im Jahresverlauf.....	63
<b>Tabelle 10:</b> Nachweisrate der <i>Arcobacter</i> - positiven Proben über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung nach Überprüfung mittels Sequenzierung im Jahresverlauf.....	64
<b>Tabelle 11:</b> <i>Arcobacter</i> - positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der qualitativen Untersuchung.....	65
<b>Tabelle 12:</b> <i>Arcobacter</i> -positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der PCR.....	66
<b>Tabelle 13:</b> <i>Arcobacter</i> - positive Proben an den einzelnen Untersuchungsstationen von 8 untersuchten Herden in % nach der Gensequenzierung.....	67
<b>Tabelle 14:</b> Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach der Mikrobiologischen Untersuchung.in %.....	68
<b>Tabelle 15:</b> Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels PCR in %.....	68
<b>Tabelle 16:</b> Nachweisrate von <i>Arcobacter</i> spp. über die quantitative Untersuchung ohne Anreicherung an den einzelnen Untersuchungsstationen nach Überprüfung mittels Gensequenzierung in %.....	69

<b>Tabelle 17:</b> Vergleichende Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweilig Untersuchungsmethoden.....	71
<b>Tabelle 18:</b> Vergleichende Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung gewonnenen Isolate an den einzelnen Untersuchungsstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden.....	73
<b>Tabelle 19:</b> Darstellung der qualitativ ermittelten <i>Arcobacter</i> - positiven Isolate der jeweiligen Untersuchungsmonate in Prozent nach der Mikrobiologischen Untersuchung, nach der PCR- Untersuchung und nach der Gensequenzierung.....	74
<b>Tabelle 20:</b> Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung ermittelten <i>Arcobacter</i> - positiven Isolate der jeweiligen Untersuchungsmonate in Prozent nach der Mikrobiologischen Untersuchung, nach der PCR- Untersuchung und nach der Gensequenzierung.....	75
<b>Tabelle 21:</b> Übersicht der nach der mikrobiologischen Untersuchung positiven <i>Arcobacter</i> - Isolate, welche sich nach der Sequenzierung als <i>Arcobacter</i> - negativ herausstellten.....	79
<b>Tabelle 22:</b> Einzelergebnisse März 2007.....	127
<b>Tabelle 23:</b> Einzelergebnisse April 2007.....	128
<b>Tabelle 24:</b> Einzelergebnisse Mai 2007.....	129
<b>Tabelle 25:</b> Einzelergebnisse Juni 2007.....	130

**Tabelle 26:** Einzelergebnisse Juli 2007.....131

**Tabelle 27:** Einzelergebnisse August 2007.....132

**Tabelle 28:** Einzelergebnisse September 2007.....133

**Tabelle 29:** Einzelergebnisse November 2007.....134

**Tabelle 30:** Ergebnisübersicht der über die quantitative Untersuchung gewonnenen  
*Arcobacter*- positiven Isolate.....135

**Tabelle 31:** Ergebnisübersicht der *Arcobacter*- positiven Isolate nach der  
qualitativen Untersuchung.....136

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Taxonomie von <i>Arcobacter</i> spp. ....	15
<b>Abbildung 2:</b> Fließschema zur qualitativen und quantitativen Untersuchung auf <i>Arcobacter</i> spp.....	45
<b>Abbildung 3:</b> Biochemische Kriterien zur Unterscheidung von <i>Arcobacter</i> spp. und <i>Campylobacter</i> spp.....	46
<b>Abbildung 4:</b> Bildliche Darstellung der qualitativ gewonnenen Isolate an den einzelnen Schlachtstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden.....	71
<b>Abbildung 5:</b> Vergleichende Darstellung der Nachweisrate der über die quantitative Untersuchung gewonnenen Isolate an den einzelnen Schlachtstationen nach den jeweiligen Untersuchungsmethoden.....	72
<b>Abbildung 6:</b> Vergleichende Darstellung der <i>Arcobacter</i> - positiven Isolate nach der qualitativen Aufarbeitungsmethode in der Mikrobiologie, der PCR- Untersuchung und der Sequenzierung.....	74
<b>Abbildung 7:</b> Vergleichende Darstellung der über die quantitative Untersuchung nachgewiesenen <i>Arcobacter</i> - positiven Isolate in der Mikrobiologie, der PCR- Untersuchung und der Sequenzierung.....	76

**Abbildung 8:** Darstellung des geometrischen Mittels der quantitativen Belastung der *Arcobacter*- positiven Isolate an den jeweiligen Stationen in lg KbE/cm<sup>2</sup> bei den Karkassen und KbE/g Fleisch bei den Teilstücken.....77

**Abbildung 9:** Verteilung der *Arcobacter*- Spezies (%) nach der Gensequenzierung der 40 gewonnenen *Arcobacter*- Isolate.....78

**Abbildung 10:** Prozentuale Übersicht der nach der Gensequenzierung *Arcobacter*- negativen Isolate.....81

## 11 Literaturverzeichnis

Al Rashid, S. T., I. Dakuna, et al. (2000).

"Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the glyA gene." J Clin Microbiol **38**(4): 1488-94.

Andersen, M. M., I. V. Wesley, et al. (2007).

"Prevalence of *Arcobacter* species in market-weight commercial turkeys." Antonie Van Leeuwenhoek. **92** 309 – 317.

Anderson, K. F., J. A. Kiehlbauch, et al. (1993).

"*Arcobacter (Campylobacter) butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population." Infect Immun **61**(5): 2220-3.

Anonymous (1996).

International Commission on Microbiological Specifications for Food. *Campylobacter*.). "Characteristics of Microbial Pathogens." Microorganisms in Food **5**.

Arimi, S. M., C. R. Fricker, et al. (1988).

"Occurrence of 'thermophilic' *campylobacters* in sewage and their removal by treatment processes." Epidemiology and infection **101:22**: 279 - 286.

Assanta, M. A., D. Roy, et al. (2002).

"Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces." J Food Prot **65**(8): 1240-7.

Atabay, H. I. and F. Aydin (2001).

"Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents." Lett Appl Microbiol **33**(6): 430-3.

Atabay, H. I., F. Aydin, et al. (2003).

"The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and identification of the isolates using SDS-PAGE." Int J Food Microbiol **81**(1): 21-8.

Atabay, H. I., D. D. Bang, et al. (2002).

"Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting." Lett Appl Microbiol **35**(2): 141-5.

Atabay, H. I. and J. E. Corry (1998).

"Evaluation of a new *arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp." Int J Food Microbiol **41**(1): 53-8.

Atabay, H. I. D. and J. E. Corry (1997).

"The prevalence of *campylobacters* and *arcobacters* in broiler chickens." J Appl Microbiol **83**(5): 619-26.

Atabay, H. I. D., J. E. Corry, et al. (1998).

"Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens." J Appl Microbiol **84**(6): 1007-16.

Atabay, H. I., A. Unver, et al. (2008).

"Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*)." Vet Microbiol **128**(3-4): 400 - 405.



Atabay, H. I. D., M. Waino, et al. (2006).

"Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry." Int J Food Microbiol **109**(1-2): 139-45.

Aydin, F., K. S. Gumussoy, et al. (2007).

"Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR." J Appl Microbiol **103**(1): 27-35.

Baker, R. C., M. D. Paredes u. R. A. Qureshi (1987):

Prevalence of *Campylobacter jejuni* in eggs and poultry meat in New York State. Poult. Sci. **66** (11), 1766-1770.

Bartholomä, A. and H. Naumann (2006).

Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Online) **1**(Supplement 2 / Dezember 2006): 1661 - 5867.

Beach, J. C., E. A. Murano, et al. (2002).

"Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter." J Food Prot **65**(11): 1687-93.

Bolton, F. J., D. R. A. Wareing, et al. (1992).

"Identification and biotyping of *Campylobacters*." Identification methods in applied and environmental microbiology. Blackwell Scientific Publ.: 151 - 161.

Bonardi, S., E. Maggi, et al. (2001).

"Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy." Int J Food Microbiol **66**(1-2): 47-53.

Brightwell, G. D., E. Mowat, et al. (2007).

"Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*." J Microbiol Methods **68**(2): 318-25.

Butzler, J. P., P. Dekeyser, et al. (1973).

"Related *Vibrio* in stools." J. Pediatr. **82**((3)): 493 - 495.

Červenka, L., Z. Malíková, et al. (2004).

"The effect of acetic acid, citric acid, and trisodium citrate in combination with different levels of water activity on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture." Folia Microbiologica **49**(1): 8 - 12.

Collins, C. I., I. Wesley, et al. (1996).

"Detection of *Arcobacter* spp. in Ground Pork by Modified Plating Methods " J Food Prot **59**(5): 448 - 452.

Corry, J. E. and H. I. Atabay (1997).

"Comparison of the productivity of cefoperazone amphotericin teicoplanin (CAT) agar and modified charcoal cefoperazone deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorum*." Int J Food Microbiol **38**(2-3): 201-9.

Corry, J. E., H. I. Atabay, et al. (2003). "Culture media for the isolation of *campylobacters*, *helicobacters* and *arcobacters*." Handbook of Culture Media for Food Microbiology: 271 ff.

D`Sa, E. M. and M. A. Harrison (2005).

"Effect of pH, NaCl Content, and Temperature on Growth and Survival of *Arcobacter* spp." J Food Prot **68**(1): 18 - 25.

De Melo, C., M. S. Alexandra, et al. (1998).

"Trisodium Phosphate Increases Sensitivity of Gram-Negative Bacteria to Lysozyme and Nisin." J Food Prot **61**: 839 - 844.

de Oliveira, S. J., A. L. Baetz, et al. (1997).

"Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil." Vet Microbiol **57**(4): 347-54.

de Oliveria, S. J., I. V. Wesley, et al. (1999).

"*Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil." J Vet Diagn Invest **11**(5): 462-4.

Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, et al. (1972).

"Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures." J. Infect. Dis. **125**((4)): 390 - 392.

Delves-Broughton, J. (1990).

"Nisin and its application as a food preservative." Journal of the Society of Dairy Technology **43**: 73 - 76.

Delves-Broughton, J. (1993).

"The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards gram-negative bacteria " International Biodeterioration & Biodegradation **32**(1-3).

Dickson, J. S., T. R. Manke, et al. (1996).

"Biphasic culture of *Arcobacter* spp." Lett Appl Microbiol **22**(3): 195-8.

Donachie, S. P., J. P. Bowman, et al. (2005).

"*Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 3): 1271-7.

Eifert, J. D., R. M. Castle, et al. (2003).

"Comparison of sampling techniques for detection of *Arcobacter butzleri* from chickens." Poult Sci **82**(12): 1898-902.

Ellis, W. A., S. D. Neill, et al. (1977).

"Isolation of *Spirillum* / *Vibrio*-like organisms from bovine fetuses." Vet Rec **100**: 451 - 452.

Engberg, J., S. L. On, et al. (2000).

"Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*." J Clin Microbiol **38**(1): 286-91.

Escherich, T. (1886).

"Beitrage zur Kenntnis der Darmbakterien. III. Ueber das Vorkommen von *Vibrionen* im Darmcanal und den Stuhlgangen der Säuglinge." Münch. Med. Wochenschr. **33**: 815 - 817.

Fera, M. T., T. L. Maugeri, et al. (2003).

"In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents." Int J Antimicrob Agents **21**(5): 488-91.

Fera, M. T., T. L. Maugeri, et al. (2004).

"Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1271-6.

Fernandez, H., G. Eller, et al. (1995).

"Toxicogenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **90**(5): 633 - 634.

Fernández, H., M. Vergara, et al. (1985).

"Desiccation resistance in thermotolerant *Campylobacter* species." Infection **13**: 197.

Festy, B. F., F. Squinazi, et al. (1993).

"Poultry meat and water as the possible sources of *Arcobacter butzleri* associated with human disease in Paris, France." Acta Gastro-Enterol. Belg. **56**: 35.

Fisher, K., C. Rowe, et al. (2007).

"The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food." Letters in Applied Microbiology **44**(5): 495-499.

Golla, S. C., E. A. Murano, et al. (2002).

"Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods." J Food Prot **65**(12): 1849-53.

Gonzalez, A., S. Botella, et al. (2007).

"Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain." J Food Prot **70**(2): 341-7.

Gonzalez, I., T. Garcia, et al. (2000).

"Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat." Lett Appl Microbiol **30**(3): 207-12.

Gude, A., T. J. Hillman, et al. (2005).

"Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing." Lett Appl Microbiol **41**(1): 82 - 87.

Harmon, K. M. and I. V. Wesley (1996).

"Identification of *Arcobacter* isolates by PCR." Lett Appl Microbiol **23**(4): 241-4.

Harmon, K. M. and I. V. Wesley (1997).

"Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other arcobacters." Vet Microbiol **58**(2-4): 215-27.

Harrass, B., S. Schwarz, et al. (1998).

"Identification and characterization of *Arcobacter* isolates from broilers by biochemical tests, antimicrobial resistance patterns and plasmid analysis." Zentralbl Veterinärmed B **45**(2): 87 - 94.

Hensyl, W. R. (1994).

"Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology." 9(39 - 63).

Hilton, C. L., B. M. Mackey, et al. (2001).

"The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments." J Appl Microbiol **91**(5): 929-32.

Ho T. K. Hoa, L. J. Lipman, et al. (2006). "*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!" Vet Microbiol **115**(1-3): 1 - 13.

Ho, T. K., L. J. Lipman, et al. (chapter 3).

"Vertical transmission of *Arcobacter* spp. in chickens." online: <http://igitur-archivelibrary.uu.nl/dissertations/2008-0123-200335/full.pdf>.

Ho, T. K., L. J. Lipman, et al. (chapter 4).

"The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses." online: <http://igitur-archivelibrary.uu.nl/dissertations/2008-0123-200335/full.pdf>.

Ho, T. K., L. J. Lipman, et al. (2006b).

"Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets." Vet Microbiol **114**(1-2): 123-33.

Houf, K., S. De Smet, et al. (2008).

"Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*." Vet Microbiol **online**.

Houf, K. D., S. L. On, et al. (2005).

"*Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 2): 713-7.

Houf, K., L. A. Devriese, et al. (2004).

"Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers." Microb Drug Resist **10**(3): 243-7.

Houf, K. D., L. De Zutter, et al. (2003).

"Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse." J Food Prot **66**(3): 364-9.

Houf, K. D., L. De Zutter, et al. (2002a).

"Assessment of the genetic diversity among *arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods." Appl Environ Microbiol **68**(5): 2172-8.

Houf, K. D., L. De Zutter, et al. (2002b).

"Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing." J Food Prot **65**(8): 1233-9.

Houf, K. D., L. A. Devriese, et al. (2001a).

"Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products." Int J Food Microbiol **71**(2-3): 189-96

Houf, K., L. A. Devriese, et al. (2001b).

"Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii* to antimicrobial agents used in selective media." J Clin Microbiol **39**(4): 1654-6.

Houf, K., A. Tutenel, et al. (2000).

"Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*." FEMS Microbiol Lett **193**(1): 89-94.

Hsueh, P. R., L. J. Teng, et al. (1997).

"Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B." J Clin Microbiol **35**(2): 489-91.

Hume, M. E., R. B. Harvey, et al. (2001).

"Genotypic variation among *arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility." J Food Prot **64**(5): 645-51.

Hurtado, A. and R. J. Owen (1997).

"A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species." J Clin Microbiol **35**(9): 2401-4.

(ICMSF), I. C. o. M. S. f. F. (2002).

"Microorganisms in Foods? Microbiological Testing in Food Safety Management." Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Jacob, J., H. Lior, et al. (1993).

"Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany." Zentralbl Hyg Umweltmed **193**(6): 557-62.



Jacobs-Reitsma, W. F. and N. M. Bolder (1998).

"The role of transport crates in *Campylobacter* contamination of broilers." in: A.J. Lastovica, D.G. Newell, and E.E Lastovica (ed.), Proceedings of the Ninth International Conference of *Campylobacters, Helicobacters* and Related Organisms. Capetown University, Capetown, South Africa: 379 - 380.

Jauk, V., C. Neubauer, et al. (2003).

"Phenotypic and genotypic differentiation of *Campylobacter* spp. isolated from Austrian broiler farms: a comparison." Avian Pathol **32**(1): 33-7.

Johnson, L. G. and E. A. Murano (2002).

"Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources." J Food Prot **65**(11): 1789-95.

Johnson, L. G. D. and E. A. Murano (1999).

"Comparison of three protocols for the isolation of *Arcobacter* from poultry." J Food Prot **62**(6): 610-4.

Jones, F. S., M. Orcutt, et al. (1931).

"*Vibriosis* (*Vibrio jejuni* n.sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves." J. Exp. Med. **53**: 853 - 864.

Kabeya, H., Y. Kobayashi, et al. (2003).

"One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species." Int J Food Microbiol **81**(2): 163-8.

Kabeya, H., S. Maruyama, et al. (2003).

"Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan." Vet Microbiol **93**(2): 153-8.

Kabeya, H., S. Maruyama, et al. (2004).

"Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan." Int J Food Microbiol **90**(3): 303-8.

Kiehlbauch, J. A., D. N. Cameron, et al. (1994).

"Evaluation of ribotyping techniques as applied to *Arcobacter*, *Campylobacter* and *Helicobacter*." Mol Cell Probes **8**(22): 109 - 115.

Kiehlbauch, J. A., C. N. Baker, et al. (1992).

"In vitro susceptibilities of aerotolerant *Campylobacter* isolates to 22 antimicrobial agents." Antimicrob Agents Chemother **36**(4): 717-22.

Kiehlbauch, J. A., D. J. Brenner, et al. (1991a).

"*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness." J Clin Microbiol **29**(2): 376-85.

Kiehlbauch, J. A., B. D. Plikaytis, et al. (1991b).

"Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species." J Clin Microbiol **29**(8): 1670-6.

King, E. O. (1957).

"Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*." J. Infect. Dis. **101**((2)): 119 - 128.

Kusmaningrum, H. D., G. Riboldi, et al. (2003).

"Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods." Int J Food Microbiol **85**(3): 227 - 236.

Lammerding, A. M. (1996).

"Isolation method for the recovery of *Arcobacter butzleri* from fresh poultry and poultry products." in: Campylobacter VIII. Proceedings of the 8th International Workshop on Campylobacters, Helicobacters and Related Organisms: 329 - 333.

Lau, S. K., P. C. Woo, et al. (2002).

"Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis." Mol Pathol **55**(3): 182-5.

Lehner, A., T. Tasara, et al. (2005).

"Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen." Int J Food Microbiol **102**(2): 127-35.

Lerner, J., V. Brumberger, et al. (1994).

"Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**(8): 660-2.

Manke, T. R., I. V. Wesley, et al. (1998).

"Prevalence and genetic variability of *Arcobacter* species in mechanically separated turkey." J Food Prot **61**(12): 1623-8.

Manke, T. R. (1996).

"Prevalence of *Arcobacter* species in Mechanically Deboned Turkey." online.

Mansfield, L. P. and S. J. Forsythe (2000).

"*Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus* - potential emerging human pathogens." Reviews in Medical Microbiol **11**(33): 161 - 170.

Marinescu, M., A. Collignon, et al. (1996).

"Biotypes and serogroups of poultry strains of *Arcobacter* sp. isolated in France." in: *Campylobacter* VIII. D.G. Newall, and J.H. Ketley, ed. Plenum, New York: 519 - 520.

Marshall, S. M., P. L. Melito, et al. (1999).

"Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene." J Clin Microbiol **37**(12): 4158-60.

Maugeri, T. L., G. P. Irrera, et al. (2005).

"Detection and enumeration of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Straits of Messina (Italy)." The New Microbiologica **28**: 177 - 182.

McFadyean, J. u. S., S. (1913).

"Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and fisheries to enquire into epizootic abortion." In: Abortion in Sheep. His Majesty's Stationary Office (HMSO); London: 1 - 64.

Mead, G. C., W. R. Hudson, et al. (1994).

"Use of marker organisms in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures." Br. Poult. Sci. **35**: 345 - 354.

Miller, W.G., et al. (2005).

"Presented at the 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helocobacter* and Related Organisms." Gold Coast, Australia.

Moreno, Y., S. Botella, et al. (2003).

"Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization." Appl Environ Microbiol **69**(2): 1181-6.

Morita, Y., S. Maruyama, et al. (2004).

"Isolation and phylogenetic analysis of *arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand." Microbiol Immunol **48**(7): 527-33.

Musmanno, R. A., M. Russi, et al. (1997).

"In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples." New Microbiol **20**(1): 63-8.

Neill, S. D., J. N. Campbell, et al. (1985).

"Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. **35**: 342 – 356.

Neill, S. D., W. A. Ellis, et al. (1979).

"Designation of aerotolerant *Campylobacter*-like organisms from porcine and bovine abortions to the genus *Campylobacter*." Res Vet Sci **27**: 180 - 186.

Neill, S. D., W. A. Ellis, et al. (1978).

"The biochemical characteristics of *Campylobacter*-like organisms from cattle and pigs." Res. Vet. Sci. **25**: 368 - 372.

Newell, D. G. and C. Fearnley (2003).

"Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens." Appl Environ Microbiol **69**: 4343 - 4351.

Ohlendorf, D. S. and E. A. Murano (2002).

"Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods." J Food Prot **65**: 1700 - 1705.

On, S. L., H. I. Atabay, et al. (2004).

"Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis." Lett Appl Microbiol **39**(4): 347-52.

On, S. L., C. S. Harrington, et al. (2003).

"Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces." J Appl Microbiol **95**(5): 1096-105.

On, S. L., T. K. Jensen, et al. (2002).

"Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark." Vet Microbiol **85**(2): 159-67.

Ongor, H., B. Cetinkaya, et al. (2004).

"Investigation of *arcobacters* in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey." Lett Appl Microbiol **38**(4): 339-44.

Otth, L., M. Wilson, et al. (2001).

"Desiccation resistance in *Arcobacter butzleri*." Brazilian Journal of Microbiology **32**: 311 - 312.

Phillips, C. A. and P. Bates (2004).

"The survival of *Arcobacter butzleri*, an emerging human pathogen, in the presence of acids and ethanol." Nutrition & Food Science **34**(5): 210 - 215.

Phillips, C. A. and J. Duggan (2002).

"The effect of temperature and citric acid, alone, and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture." Food Control **13**(6-7): 463 - 468.

Phillips, C. A. (2001).

"*Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control." Trends in Food Science & Technology **12**: 263 - 275.

Phillips, C. A. (1999).

"The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*." Lett Appl Microbiol **29**: 424 - 428.

Prouzet-Mauléon, V., L. Labadi, et al. (2006).

"*Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen." Emerging Infectious Diseases, 2006 **12**(2): 307 - 309.

Rasschaert, G., K. Houf, et al. (2006).

"*Campylobacter* contamination during poultry slaughter in Belgium." J Food Prot **69**: 31 - 41.

Reich, F. (2007).

Quantifizierung und Prävalenz thermophiler *Campylobacter* spp. in der Broilerschlachtung und Fleischverarbeitung im Rahmen einer Langzeitstudie. Dissertation. Institut für Lebensmittelsicherheit und -qualität. Tierärztliche Hochschule Hannover.

Rice, E. W., M. R. Rodgers, et al. (1999).

"Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water." Lett Appl Microbiol **28**(1): 31-5.

Rivas, L. D., N. Fegan, et al. (2004).

"Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat." Int J Food Microbiol **91**(1): 31-41.

Rohder, A., J. Kleer, et al. (2007).

"Using microbiological analysis by JOHNSON & MURANO and multiplex PCR by HARMON & WESLEY for the identification of *Arcobacter* spp. in fresh poultry and minced beef sold in retail markets in Berlin." Archiv für Lebensmittelhyg. **58**(5): 188 - 191.

Schroeder-Tucker, L., I. V. Wesley, et al. (1996).

"Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses." J Vet Diagn Invest **8**(2): 186-95.

Scullion, R., C. S. Harrington, et al. (2004).

"A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland." J Food Prot **67**(4): 799-804.

Sebald, M. u. V., M. (1963).

"Teneur en bases de l'ADN et classification des *vibrions*." Ann. Inst. Pasteur (Paris) **105**: 897 - 910.

Sievert, S. M., E. B. Wieringa, et al. (2007).

"Growth and mechanism of filamentous-sulfur formation by Candidatus *Arcobacter sulfidicus* in opposing oxygen-sulfide gradients." Environ Microbiol **9**(1): 271-6.

Skirrow, M. B. and J. P. Butzler (2000).

"Clinical aspects of *Campylobacter* Infection." In: *Campylobacter* 2nd Edition. Nachamkin, I. and Blaser, M.J.: 69 - 88.

Skirrow, M. B. (1994).

"Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria." J Comp. Path. **111**: 113 - 149.

Skirrow, M. B. (1977).

"*Campylobacter* enteritis: a "new" disease." Br. Med. J. **2 (6078)**: 9 - 11.

Smith, T. M. D. u. M. S. T. (1919).

"Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, N. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle." J. Exp. Med. **28**: 299 - 311.



Snelling, W. J., M. Matsuda, et al. (2006).

"Under the microscope: *Arcobacter*." Lett Appl Microbiol **42**(1): 7-14.

Snelling, W. J., M. Matsuda, et al. (2005).

"Under the Microscope: *Campylobacter jejuni*." Lett Appl Microbiol **41**: 297 - 302.

Son, I., M. D. Englen, et al. (2007a).

"Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses." Int J Antimicrob Agents **29**(4): 451-5.

Son, I. D., M. D. Englen, et al. (2007b).

"Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing." Int J Food Microbiol **113**(1): 16-22.

Son, I. D., M. D. Englen, et al. (2006).

"Genetic diversity of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing." J Food Prot **69**(5): 1028-33.

Stampi, S., G. De Luca, et al. (1999).

"Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *campylobacters* and *Arcobacter* in sewage sludge." Zentralbl Hyg Umweltmed **202**(1): 19-27.

Stampi, S., O. Varoli, et al. (1993).

"*Arcobacter cryaerophilus* and thermophilic *campylobacters* in a sewage treatment plant in Italy: two secondary treatments compared." Epidemiol Infect **110**(3): 633-9.

Stiny, S., M. Fredriksson-Ahomaa, et al. (2006). "

Nachweis und Differenzierung von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen: Vergleich kultureller und molekularbiologischer Nachweismethoden."

Stoeva, K. D. and F. Bruce Ward (2006).

"Genome mapping of *Arcobacter butzleri*; Druckversion." FEMS Microbiol Lett **256**(2): 290-7.

Suarez, D. L., I. V. Wesley, et al. (1997).

"Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine." Vet Microbiol **57**(4): 325-36.

Taylor, D. N., J. A. Kiehlbauch, et al. (1991).

"Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea." J Infect Dis **163**(5): 1062-7.

Tee, W., R. Baird, et al. (1988).

"*Campylobacter cryaerophila* isolated from a human." J Clin Microbiol **26**: 2469 - 2473.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, et al. (1995).

"Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol **33**(9): 2233-9.

Thwaites, R. T. and J. A. Frost (1999).

"Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolated from humans in north west England and Wales." J. Clin. Path. **52**(11): 812 - 814.

Tsang, R. S. W., J. M. C. Luk, et al. (1996).

"Immunochemical characterization of a haemagglutinating antigen of *Arcobacter* spp." FEMS Microbiol Lett(209 - 213).

Van Driessche, E. and K. Houf (2008).

"Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions." J Appl Microbiol.

Van Driessche, E. and K. Houf (2007a).

"Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork." Int J Food Microbiol.

Van Driessche, E. D. and K. Houf (2007b).

"Discrepancy between the occurrence of *Arcobacter* in chickens and broiler carcass contamination." Poult Sci **86**(4): 744-51.

Van Driessche, E., K. Houf, et al. (2005).

"Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium." Vet Microbiol **105**(2): 149-54.

Van Driessche, E., K. Houf, et al. (2004).

"Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs." Res Microbiol **155**(8): 662-6.

Van Driessche, E., K. Houf, et al. (2003).

"Isolation of *Arcobacter* species from animal feces." FEMS Microbiol Lett **229**(2): 243-8.

Vandamme, P. (2000).

"Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*." In: Campylobacter 2nd Edition. Nachamkin, I. and Blaser, M.J.: 3 - 26.

Vandamme, P., B. A. Giesendorf, et al. (1993).

"Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting." J Clin Microbiol **31**(12): 3317-9.

Vandamme, P., P. Pugina, et al. (1992).

"Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school." J Clin Microbiol **30**(9): 2335-7.

Vandamme, P. and H. Goossens (1992a).

"Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: a review." Zentralbl Bakteriol **276**(4): 447-72.

Vandamme, P., M. Vancanneyt, et al. (1992b).

"Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." Int J Syst Bacteriol **42**(3): 344-56.

Vandamme, P. and J. De Ley (1991a). "Proposal for a new family, *Campylobacteriaceae*." Int J Syst Bacteriol **41**(33): 451 - 455.

Vandamme, P., E. Falsen, et al. (1991b).

"Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov." Int J Syst Bacteriol **41**(1): 88-103.

Vandenberg, O., A. Dediste, et al. (2004).

"*Arcobacter* species in humans." Emerg Infect Dis **10**(10): 1863-7.

Villarruel-Lopez, A., M. Marquez-Gonzalez, et al. (2003).

"Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells." J Food Prot **66**(8): 1374-8.

Vincent, R., J. Dumas, et al. (1947).

"Septicémie grave au cours de la grossesse, due à un *vibrion*." Bull. C. R. Acad. Nat. Med. **131**: 90 - 92.

Wesley, I. V., S. J. Wells, et al. (2000).

"Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle." Appl Environ Microbiol **66**(5): 1994-2000.

Wesley, I. V. and A. L. Baetz (1999).

"Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry." Poult Sci **78**(4): 536-45.

Wesley, I. (1996a).

"*Arcobacter* and *Helicobacter* - Risks for foods and beverages." J Food Prot **59**: 1127 - 1132.

Wesley, I. V., A. L. Baetz, et al. (1996b).

"Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*." Infect Immun **64**(6): 2295-9.

Wesley, I. V., L. Schroeder-Tucker, et al. (1995).

"*Arcobacter*-specific and *Arcobacter butzleri*-specific 16S rRNA-based DNA probes." J Clin Microbiol **33**(7): 1691-8.

Wesley, I. (1994).

"*Arcobacter* infections." Handbook of Zoonoses: 181 - 190.

Winters, D. K. and M. F. Slavik (2000).

"Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products." Mol Cell Probes **14**(2): 95-9.

Wirsen, C. O., S. M. Sievert, et al. (2002).

"Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* sp. that produces filamentous sulfur." Appl Environ Microbiol **68**(1): 316-25.

Woo, P. C., K. T. K. Chong, et al. (2001).

"Identification of *Arcobacter cryaerophilus* isolated from a traffic accident victim with bacteremia by 16S ribosomal RNA gene sequencing." Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **40**: 125 - 127.

Wybo, I., J. Breynaert, et al. (2004).

"Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea." J Clin Microbiol **42**(4): 1851-2.

Yan, J. J., W. C. Ko, et al. (2000).

"*Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis." J Formos Med Assoc **99**(2): 166-9.

Zakharova, N., B. J. Paster, et al. (1999).

"Fused and overlapping rpoB and rpoC genes in *Helicobacters*, *Campylobacters*, and related bacteria." J Bacteriol **181**(12): 3857-9.

Zanetti, F., O. Varoli, et al. (1996).

"Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin." Int J Food Microbiol **33**(2-3): 315

ZDG (Zentralverband der Deutschen Geflügelwirtschaft).

Geflügeljahrbuch 2005; Qualität von Geflügelprodukten S. 225.

## 12 Anhang

**Tabelle 22:** Einzelergebnisse März 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. skirrowii</i>
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	positiv	-	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	positiv	-	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	positiv	-	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
	Oberkeule II	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Oberkeule III	-	-	-	-
	Oberkeule IV	-	-	-	-
	Oberkeule V	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-
Zerlegeband	Sammeloberkeule	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Sammeloberkeule	-	-	-	-
	Sammeloberkeule	-	-	-	-

**Tabelle 23:** Einzelergebnisse April 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	2,2 (positiv)	positiv.	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	1,8 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse V	positiv	1,8 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
		positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	1,8 (positiv)	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	2,4 (positiv)	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	1,3 (positiv)	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse V	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	-	-	-	-
	Oberkeule III	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule IV	-	-	-	-
	Oberkeule V	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-



**Tabelle 24:** Einzelergebnisse Mai 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	positiv	-	positiv	<i>Comamonas spp.</i>
	Karkasse III	-	1,7 (positiv)	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	1,3 (positiv)	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse VI	-	-	-	-
	Karkasse VII	-	-	-	-
	Karkasse VIII	-	-	-	-
	Karkasse IX	-	-	-	-
	Karkasse X	-	-	-	-
nach Eviszeration	Karkasse I	-	2,2 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse II-1	-	2,1 (positiv)	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse II-2	-	2,1 (positiv)	positiv	<i>Comamonas spp.</i>
	Karkasse III	-	2,4 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	1,7 (positiv)	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
		-	2.1 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse VI	-	-	-	-
	Karkasse VII	-	-	-	-
	Karkasse VIII	-	-	-	-
Karkasse IX	-	-	-	-	
Karkasse X	-	-	-	-	
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	2,2 (positiv)	positiv	<i>A. cryaerophilus</i>
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
	Karkasse VI	-	-	-	-
	Karkasse VII	-	-	-	-
	Karkasse VIII	-	-	-	-
	Karkasse IX	-	-	-	-
	Karkasse X	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	-	-	-	-
	Oberkeule III	-	-	-	-
	Oberkeule IV	-	-	-	-
	Oberkeule V	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-

**Tabelle 25:** Einzelergebnisse Juni 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse III	positiv	-	negativ	<i>Delftia spp.</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
vor Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	positiv	-	positiv	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	-	-	-	-
	Oberkeule III	-	-	-	-
	Oberkeule IV	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule V	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-

**Tabelle 26:** Einzelergebnisse Juli 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; ? positiv: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Positiven; ? negativ: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Negativen; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II-1	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse II-2	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
vor Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	positiv	-	positiv	<i>Comamonas spp.</i>
	Karkasse III	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	-	-	-	-
	Oberkeule III	-	-	-	-
	Oberkeule IV-2	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Oberkeule IV-1a	positiv	-	? positiv	<i>Comamonas spp.</i>
	Oberkeule IV-1b	positiv	-	? positiv	<i>Comamonas spp.</i>
Zerlegeband	Oberkeule V	-	-	-	-
	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte III	positiv	-	pos.	<i>A. butzleri</i>
	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon III	positiv	-	pos.	<i>A. butzleri</i>

**Tabelle 27:** Einzelergebnisse August 2007 positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; ? positiv: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Positiven; ? negativ: kein eindeutiges Ergebnis mit Tendenz zum Negativen; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	positiv	-	negativ	<i>Comamonas spp.</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Eviszeration	Karkasse I	positiv	-	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
vor Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	? positiv	<i>Acinetobacter spp.</i>
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	-	1,7 (positiv)	negativ	<i>Delftia spp.</i>
	Oberkeule III	positiv	-	negativ	<i>Delftia spp.</i>
	Oberkeule IV	-	-	-	-
	Oberkeule V	positiv	-	negativ	<i>Delftia spp.</i>
Zerlegeband	Brustabschnitte I	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	positiv	-	? negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-

**Tabelle 28:** Einzelergebnisse September 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	positiv	-	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
		positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	1,3 (positiv)	positiv	<i>A. skirrowii</i>
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
		positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
vor Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
Zerlegeband	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	-	-	-	-
	Flügel III	-	-	-	-
Zerlegeband	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule III	-	-	-	-
	Oberkeule IV	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule V	-	-	-	-
Zerlegeband	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II	-	-	-	-
	Brustabschnitte III	-	-	-	-
Zerlegeband	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>

**Tabelle 29:** Einzelergebnisse November 2007; positiv: nachgewiesene *Arcobacter*-Belastung; -: kein *Arcobacter*-Nachweis; negativ: keine Bestätigung des positiven *Arcobacter*-Nachweises; Quantitative Angabe in log 10.

Station	Probe	Mibi Qualitativ	Mibi Quantitativ	PCR	Sequenzierung
vor Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	positiv	-	negativ	<i>Acinetobacter spp.</i>
	Karkasse V	positiv	-	negativ	<i>Acinetobacter spp.</i>
nach Eviszeration	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	positiv	-	negativ	<i>Comamonas spp.</i>
	Karkasse V	positiv	-	negativ	<i>Comamonas spp.</i>
vor Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV	-	-	-	-
	Karkasse V	-	-	-	-
nach Kühlung	Karkasse I	-	-	-	-
	Karkasse II	-	-	-	-
	Karkasse III	-	-	-	-
	Karkasse IV-1	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Karkasse IV-2	positiv	-	negativ	<i>Ochrabactrum spp.</i>
Zerlegeband	Karkasse V	-	-	-	-
	Flügel I	-	-	-	-
	Flügel II	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
Zerlegeband	Flügel III	-	-	-	-
	Oberkeule I	-	-	-	-
	Oberkeule II	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule III	positiv	1,7 (positiv)	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Oberkeule IV	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
Zerlegeband	Oberkeule V	-	-	-	-
	Brustabschnitte I	-	-	-	-
	Brustabschnitte II-1	positiv	-	negativ	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Brustabschnitte II-2	positiv	-	positiv	<i>A. butzleri</i>
	Brustabschnitte II-3	positiv	-	negativ	<i>Comamonas spp.</i>
Zerlegeband	Brustabschnitte III	-	-	-	-
	Medaillon I	-	-	-	-
	Medaillon II	-	-	-	-
	Medaillon III	-	-	-	-

**Tabelle 30:** Ergebnisübersicht der über die quantitative Untersuchung gewonnenen *Arcobacter*- positiven Isolate; k.U.: keine Untersuchung; k. N.: kein Nachweis; K1: Karkassen nach dem Brühen und Entfedern; K2: Karkassen nach der Eviszeration; K4: Karkassen nach der Kühlung.

Monat	Labor- Nr.	Probenart	<i>Arcobacter spp.</i>	Log10 KbE/cm <sup>2</sup>
<b>März</b>	k.U.			
<b>April</b>	563	K1	<i>A. skirrowii</i>	2,2
	565-2	K1	<i>A. skirrowii</i>	1,8
	566	K1	<i>A. skirrowii</i>	1,8
	569-2	K2	<i>A. cryaerophilus</i>	1,8
	571-2	K2	<i>A. cryaerophilus</i>	2,4
	576	K4	<i>A. butzleri</i>	1,3
<b>Mai</b>	721-1	K1	<i>A. butzleri</i>	1,7
	723-2	K1	<i>A. butzleri</i>	1,3
	724-1	K1	<i>A. skirrowii</i>	2,2
	725-2	K2	<i>A. butzleri</i>	2,1
	726-1	K2	<i>A. skirrowii</i>	2,4
	728-1	K2	<i>A. cryaerophilus</i>	1,7
	728-2	K2	<i>A. skirrowii</i>	2,1
	730-2	K4	<i>A. cryaerophilus</i>	2,2
<b>Juni</b>	k.N.			
<b>Juli</b>	k.N.			
<b>August</b>	k.N.			
<b>September</b>	1603	K2	<i>A. skirrowii</i>	1,3
<b>November</b>	k.N.			

**Tabelle 31:** Ergebnisübersicht der Arcobacter- positiven Isolate nach der qualitativen Untersuchung; K1: Karkassen nach dem Brühen und Entfedern; K2: Karkassen nach der Eviszeration; K3: Karkassen vor der Kühlung; K4: Karkassen nach der Kühlung; OK: Oberkeule; BA: Brustabschnitte; M: Medaillons; k.N.: kein Nachweis.

<b>Monat</b>	<b>Labor- Nr.</b>	<b>Probenart</b>	<b><i>Arcobacter spp.</i></b>
<b>März</b>	355	Flügel	<i>A. cryaerophilus</i>
	357-2	OK	<i>A. cryaerophilus</i>
	358	OK	<i>A. butzleri</i>
	372-1	K1	<i>A. skirrowii</i>
	374-2	K2	<i>A. skirrowii</i>
	377	K2	<i>A. cryaerophilus</i>
	382	K4	<i>A. cryaerophilus</i>
<b>April</b>	595-1	K1	<i>A. skirrowii</i>
	595-2	K1	<i>A. butzleri</i>
<b>Mai</b>	k.N.		
<b>Juni</b>	978-1	K1	<i>A. butzleri</i>
	1015-2	K3	<i>A. butzleri</i>
<b>Juli</b>	1299-2	OK	<i>A. butzleri</i>
	1303-2	BA	<i>A. butzleri</i>
	1306-2	M	<i>A. butzleri</i>
<b>August</b>	1457	K1	<i>A. butzleri</i>
	1462	K2	<i>A. skirrowii</i>
<b>September</b>	1630	K1	<i>A. skirrowii</i>
	1632	K1	<i>A. butzleri</i>
	1634-1	K1	<i>A. butzleri</i>
	1634-2	K1	<i>A. butzleri</i>
	1635-2	K2	<i>A. skirrowii</i>
	1639-1	K2	<i>A. butzleri</i>
	1639-2	K2	<i>A. butzleri</i>
	1663	M	<i>A. butzleri</i>
<b>November</b>	1915-2	BA	<i>A. butzleri</i>



## 13 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klein für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Lebensmittelqualität und – sicherheit durchführen zu können.

Frau Dr. Atanassova danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Koreferentin zu betreuen.

Meinen Mitarbeitern im mikrobiologischen Labor (B. Führung, S. Ortaeri, S. Korff, A. Schridde und Dr. F. Reich) danke ich für die hervorragende Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben und für euer freundliches und hilfsbereites Wesen, dass über die Oberflächlichkeit des Tagesgeschäfts hinausreicht.

Den Kollegen der molekulargenetischen Abteilung (M. von Ahlen, Dr. U. Peters, Dr. U. Körner, Dr. M. Langen, Dr. Upmann) danke ich für die qualifizierte Hilfe bei der Gensequenzierung und für die exzellente Atmosphäre, welche durch ihre unverwechselbare Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich.

Meinen Kondoktoranden N. Türck und J. Bitter danke ich für die aufmunternden Worte, welche mich immer wieder motiviert haben.

Der Tanzgruppe Nelson danke ich für die schöne Zeit, ihre Hilfe und für die Gespräche, die einfach mal nötig waren. Ein besonderer Dank gebührt Schubator für die umfangreiche Hilfe bei der Formatierung.

Meinen Eltern bin ich von Herzen dankbar für die Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben.

Dir Astrid, danke ich für den Rückhalt, den du mir gegeben hast und für deine Art wie du bist, die es mir so einfach macht dich zu lieben.