

Aus dem Institut für  
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
Veterinärwissenschaftliches Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle, Vorstand a.D.

---

# **Vergleich von PCR- und kulturellen Nachweisverfahren zum Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
von  
Sascha Stiny  
aus Kandel

München 2009

## Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Arcobacter</i> Bouillon
(AB)	Applied Biosystems
AHM	<i>Arcobacter</i> Houf-Medium
AJMM	<i>Arcobacter</i> Johnson-Murano-Medium
A.	<i>Arcobacter</i>
ASM	<i>Arcobacter</i> Selectiv-Medium
ATCC	American Type Culture Collection = Amerikanische Zellkultursammlung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
BHI	brain heart infusion = Gehirn-Herz-Bouillon
bp	Basenpaare, Größenangabe bei DNA und RNA
CAT	Cefoperazon, Amphotericin B, Teicoplanin
CCUG	Kultursammlung Universität Göteborg
CDT	Cytolethal Distending Toxin
CHO	Chinese hamster ovary = Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster
CIN	Cefsulodin, Irgasan, Novobiozin
CVA	Cefoperazon, Vancomycin, Amphotericin-B
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d	Tage
DSMZ	Deutsche Sammlung mikrobiologischer Zellkulturlinien
D-Wert	dezimale Reduktionszeit
EFSA	European Food Safety Authority, europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EMJH-P80	Ellinghausen, McCullough, Johnson-Harris, Polysorbat-80
EU	Europäische Union
g	Gramm
GITC	Guanidinthiocyanat
h	Stunden
HeLa	menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms
HEp-2	humane Zellkulturen (Caucasian larynx carcinoma)
INT	Intestinum
JM-Agar	Johnson und Murano Agar
KbE/g	Kolonie bildende Einheiten pro Gramm
LA31BT	numerische Benennung für <i>A. halophilus</i>
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
log	Logarithmus
mCCDA	modifizierter Charcoal Cefoperazon Deoxycholate Agar
mg/l	Milligramm pro Liter
MHK	minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minuten
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
M	molar
m-PCR	Multiplex-PCR
NaCl	Kochsalz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

TSA	Trypton-Soja-Agar
VacA	140kiloDalton großes, heterodimeres Protein mit vakuolisierender, toxischer Wirkung auf epitheliale Zellen
U	Einheit der Enzymaktivität

# Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG.....	6
LITERATUR.....	7
1 TAXONOMIE UND EIGENSCHAFTEN VON ARCOBACTER SPP.....	7
2 BEDEUTUNG VON ARCOBACTER BEI MENSCH UND TIER.....	10
2.1 Das Vorkommen beim Tier.....	11
2.2 Das Vorkommen beim Menschen.....	13
3 PATHOMECHANISMEN UND VIRULENZFAKTOREN.....	15
4 INFektionsQUELLEN UND ÜBERTRAGUNG.....	16
5 ARCOBACTER IN LEBENSMITTELN.....	18
6 DIAGNOSTIK VON ARCOBACTER.....	21
6.1 Kulturelle Verfahren.....	21
6.2 Nachweisverfahren mit PCR.....	25
6.3 Identifizierungsverfahren.....	26
B EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....	29
1 ZIEL DER ARBEIT .....	29
1.1 Methodenvergleich.....	29
1.2 Vorkommen von Arcobacter spp. in Geflügelfleisch.....	29
2 MATERIAL.....	29
2.1 Herkunft der Stämme .....	29
2.2 Probenmaterial.....	29
2.3 Untersuchungsmaterial.....	30
3 METHODE.....	30
3.1 Kulturelle Nachweisverfahren.....	31
3.1.1 Modifikation der kulturellen Nachweisverfahren.....	31
3.1.2 Untersuchungsablauf der kulturellen Nachweisverfahren.....	34
3.2 PCR-Nachweisverfahren.....	36
3.2.1 Modifikation der Anreicherung für die PCR Methode.....	36
3.2.2 Modifikation der DNA-Probenaufreinigung.....	36
3.2.3 Untersuchungsablauf PCR-Screening.....	38
3.2.4 Genotypische Identifizierung.....	40
ERGEBNISSE .....	43
4 VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN MODIFIKATIONEN VON ANZUCHTMEDIEN.....	43
4.1 Ergebnisse flüssige Nährmedien .....	43
4.2 Ergebnisse feste Nährmedien .....	44
5 VERGLEICH DER MODIFIKATIONEN DER PCR.....	44
6 VERGLEICH DER KULTURELLEN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN ZUM ERREGERNACHWEIS.....	45
7 NACHWEIS VON ARCOBACTER SPP. IN DER GESAMTHEIT DER UNTERSUCHTEN PROBEN MIT MODIFIZIERTER PCR NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	46
8 BESTÄTIGUNG VON ARCOBACTER SPP. IN DEN ERZEUGNISGRUPPEN MIT PCR NACH HOUF ET AL. (2000).....	47
9 GEGENÜBERSTELLUNG DER PCR-METHODIK MIT DEN MODIFIZIERTEN KULTURELLEN NACHWEISVERFAHREN.....	48
C DISKUSSION.....	50
D ZUSAMMENFASSUNG .....	56
E SUMMARY .....	58
F ANHANG .....	60
1 NÄHRMEDIEN UND REAGENZIEN FÜR KULTURELLEN NACHWEIS: BOUILLONS.....	60
2 NÄHRMEDIEN UND REAGENZIEN FÜR KULTURELLEN NACHWEIS: SELEKTIVE NÄHRBÖDEN.....	65
3 NÄHRMEDIEN UND REAGENZIEN FÜR KULTURELLEN NACHWEIS: NÄHRBODEN FÜR SUBKULTUREN.....	69

4 NÄHRMEDIEN UND REAGENZIEN FÜR SCREENING- UND M-PCR.....	70
5 GERÄTE UND LABORBEDARF.....	70
5.1 Laborgeräte-Grundausstattung.....	70
5.2 Spezialanschaffungen für die PCR.....	73
6 ÜBERSICHTSTABELLEN UND ABBILDUNGEN ZU DEN UNTERSUCHUNGEN.....	75
G LITERATURVERZEICHNIS.....	97
H SONSTIGES.....	110
1 TABELLENVERZEICHNIS.....	110
2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	111
3 DANKSAGUNG.....	112
4 LEBENSLAUF.....	113

## Einleitung

In den letzten zehn Jahren hat das mikroaerobe Bakterium *Arcobacter* durch sein Vorkommen in Lebensmitteln eine erhöhte Aufmerksamkeit erreicht. Jedoch ist bislang kein konventionelles Testverfahren für den routinemäßigen Labornachweis von *Arcobacter* verfügbar. Eine Schwierigkeit besteht darin, dass *Arcobacter* spp. und *Campylobacter* spp. häufig gemeinsam auftreten und mit routinemäßig verwendeten, wie aber auch gesetzlich laut § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) vorgeschriebenen, kulturellen Verfahren nicht sicher voneinander zu unterscheiden sind. Von wesentlicher Bedeutung bei dem Nachweis von *Arcobacter* ist, dass der Mikroorganismus aerotolerant ist und ein mesophiles Wachstumsoptimum aufweist (Vandamme et al., 1991).

Vor allem in Geflügelfleisch konnte international eine hohe Nachweisrate für *Arcobacter* erzielt werden (Atabay et al. 2003; Morita et al., 2004; Mac et al., 2006). Aber auch in weiteren rohen Lebensmitteln anderer Nutztiere konnte das Bakterium nachgewiesen werden (Rivas et al., 2004; Rohder et al., 2007). Neben *Arcobacter* (*A.*) *cryaerophilus* und *A. skirrowii* scheint *A. butzleri* die am häufigsten mit Erkrankungen beim Menschen assoziierte Spezies zu sein (Lehner et al., 2005). Eine sichere Identifizierung von *Arcobacter* spp. ist anhand seiner morphologischen und biochemischen Eigenschaften nicht möglich. Aus diesem Grund werden zur Diagnostik von *Arcobacter* spp. die bisher angewandten kulturellen Nachweismethoden zur Isolierung von *Campylobacter* spp. und *Helicobacter* spp. durch PCR Methoden ergänzt (Houf et al., 2000). Bislang ist die Rate an falsch Positiven, wie aber auch an falsch Negativen, bei der Identifizierung von *Arcobacter* spp. hoch. Aufgrund der fehlenden Routinediagnostik ist anzunehmen, dass die wahre Prävalenz von *Arcobacter* spp. in Lebensmitteln, wie aber auch als Erreger von Krankheiten bei Mensch und Tier unterschätzt wird (Vandenberg et al., 2004; Ho et al., 2006).

In dieser Studie wurden vier kulturelle Methoden und eine PCR Methode ausgewählt. Zuerst wurden diese Methoden für den Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* optimiert und danach die Methoden verwendet, um vom Geflügel stammende Lebensmittelproben auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. zu untersuchen.

## Literatur

### 1 Taxonomie und Eigenschaften von *Arcobacter* spp.

Die Familie *Campylobacteriaceae* umfasst die vier Genera *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Wolinella* und *Helicobacter*, die phylogenetisch eng miteinander verwandt sind. Die ursprünglich als *Campylobacter* (*C.*) *cryaerophila* (von lat.: Kälte liebende und in der Luft befindliche) benannte Gattung *Arcobacter* spp. umfasst gramnegative stäbchenförmige Bakterien (Neill et al., 1985). Dieses Bakterium wurde zum ersten Mal von abgetriebenen Föten bei Rindern isoliert und erst später bei Schweinen, Geflügel, wie aber auch in Trinkwasser und weiteren Umweltproben nachgewiesen (Wesley, 1996A). *Arcobacter* wächst in Anwesenheit von Luftsauerstoff und ist somit aerotolerant. Ein bevorzugtes Wachstum zeigt *Arcobacter* unter Bedingungen, bei denen die Sauerstoffkonzentration geringer ist als in der Luft (Vandamme et al., 1992B).

Der Genus *Arcobacter* umfasst derzeit sechs verschiedene Spezies (McClung et al., 1983; Vandamme et al., 1992B; Wirsen et al., 2002; Donachie et al., 2005; Houf et al., 2005):

- ⇒ *Arcobacter butzleri*
- ⇒ *A. cryaerophilus*
- ⇒ *A. skirrowii*
- ⇒ *A. nitrofigilis*
- ⇒ *A. halophilus*
- ⇒ *A. cibarius*

Die Heterogenität innerhalb der Arten ist groß. Die Zahl der genotypischen Arten in einem Tiermodell für *A. skirrowii* reichte von eins bis sechs, für *A. cryaerophilus* von eins bis zehn und für *A. butzleri* von eins bis sieben (Kabeya et al., 2003). Auch On et al. (2002) konnten diese Heterogenität bestätigen.

*A. butzleri* und *A. cryaerophilus* sind im tierischen Organismus, in Nahrungsmitteln und Wasser zu finden. Sie stehen in engem Zusammenhang mit menschlichen Durchfallerkrankungen und Bakteriämie (Lerner et al., 1994; Vandenberg et al., 2004). *A. skirrowii* ist sowohl in tierischen Organismen, als auch beim erkrankten Menschen nachgewiesen worden (Vandamme et al., 1992B; Mansfield und Forsythe, 2000; Phillips, 2001A, 2001B, Wybo et al., 2004; Lehner et al., 2005). *A. skirrowii* ist somit ebenfalls als eine mit Erkrankungen beim Menschen assoziierte Spezies anzusehen. *A. nitrofigilis* ist ein stickstoff-

bindendes Bakterium, welches man in den Wurzeln von *Spartina alterniflora*, einer salzliebenden Pflanze, nachgewiesen hat, scheint jedoch keine Bedeutung im Krankheitsgeschehen des Menschen zu spielen (McClung et al., 1983). Im Jahr 2005 ist auf Hawaii *A. halophilus*, eine weitere äußerst salztolerante Spezies, gefunden worden, die aber ebenfalls nicht bei Erkrankungen des Menschen von Relevanz zu sein scheint (Donachie et al., 2004, 2005).

Eine weitere Spezies ist *A. cibarius*. Bisher ist nur wenig über *A. cibarius* bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sein Vorkommen beim Auftreten von menschlichen Krankheiten, wie z. B. Gastroenteritis, eine Rolle spielt, wie dies auch bei eng verwandten Arten *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* der Fall ist. Des Weiteren wird angenommen, dass auch *A. cibarius* bei Geflügel viel häufiger vorkommt, als bisher angenommen wurde (Houf et al., 2005).

Neben den erwähnten Spezies sind eine Reihe von potentiell neuen Arten beschrieben worden, die in Ölfeldern, im Meerwasser und auf Korallenoberflächen gefunden wurden (Wirsen et al., 2002).

*Arcobacter* spp. und *Campylobacter* spp. sind sowohl in ihren morphologischen, als auch in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich (Atabay et al., 1998A). Daher können bei der bisher angewandten Methodik schnell Fehler bei der Identifizierung von *Arcobacter* spp. auftreten, die in dem Nachweis von falsch Positiven, wie aber auch falsch Negativen resultieren.

Ein bedeutender Punkt, um das Infektionsrisiko für Mensch und Tier einschätzen zu können, ist die Resistenz des Mikroorganismus gegenüber äußeren Einflüsse wie z. B. niedrige oder hohe Temperaturen, pH-Wert, Salz- und Säurekonzentrationen. *Arcobacter* spp. kann längere Zeit unter Kühlhausbedingungen und bei Temperaturen von -20 °C überleben (Hilton et al., 2001). Jedoch ist das Bakterium hitzeempfindlich. So liegt die dezimale Reduktionszeit (D-Wert), welche die Zeit angibt, die für die Reduktion eines Mikroorganismus auf ein Zehntel seiner Ausgangskeimzahl bei einer definierten Temperatur nötig ist, angibt, für *A. butzleri* bei 55 °C 0,4 min (Hilton et al., 2001). Auch gegenüber extremen pH-Werten ist *Arcobacter* spp. empfindlich. Bei pH-Werten unter 5,5 und über 8,0 ist das Bakterium nicht mehr lebensfähig. Und auch eine Salzkonzentration von 2 % inaktiviert die Vermehrungsfähigkeit. (Hilton et al., 2001). Dagegen ist das Bakterium in Kot für einen Zeitraum von drei Wochen, in Wasser für vier Wochen und im Urin fünf Wochen bei niedrigen Umgebungstemperaturen überlebensfähig (Wesley et al., 2000). Gegenüber Kon-



servierungsmitteln in Lebensmitteln verhält sich der Erreger unterschiedlich resistent. So ist er schon gegenüber niedrigen Konzentrationen von Milch- und Zitronensäure empfindlich, jedoch kaum gegenüber Natrium-Laktat oder Nisin (Phillips, 1999). Die Überlebensfähigkeit des Erregers in Fleischerzeugnissen ist jedoch gering (Mac et al., 2006).

Nach der Auflistung der Charakteristika für den Genus *Arcobacter* werden nachfolgend die morphologischen und biochemischen Eigenschaften der mit Erkrankungen beim Menschen assoziierten Spezies aufgeführt.

*A. butzleri* ist in der Lage, sein mikroaerobes Wachstum auf eine Temperaturbreite von 15 °C und 35 °C anzupassen, wobei der optimale Temperaturbereich von 25 °C bis 30 °C reicht. Morphologisch ist *A. butzleri* 0,2 µm bis 0,9 µm breit, 1 µm bis 3 µm lang und, aufgrund seiner polaren Begeißelung, beweglich. Auf Blutagar wächst die Spezies in 2 mm großen, runden, leicht glänzenden; halbdurchscheinenden und beige-grauen Kolonien (Abb. 1). Als Energiequelle nutzt *A. butzleri* Pyruvat, eine Säure, anstatt wie die meisten gramnegativen Bakterien Kohlenhydrate zu fermentieren. Diese biochemische Eigenschaft ist eine der wenigen, die zur Identifizierung mittels biochemischer Testverfahren herangezogen werden kann. Daneben fällt die Katalasereaktion meist negativ aus, kann jedoch auch ein schwach positives Ergebnis zeigen. Auch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit ist meistens feststellbar und die Reaktion im Indoxylacetat-Test zeigt ein positives Ergebnis (On et al., 1996; Atabay et al., 1997).

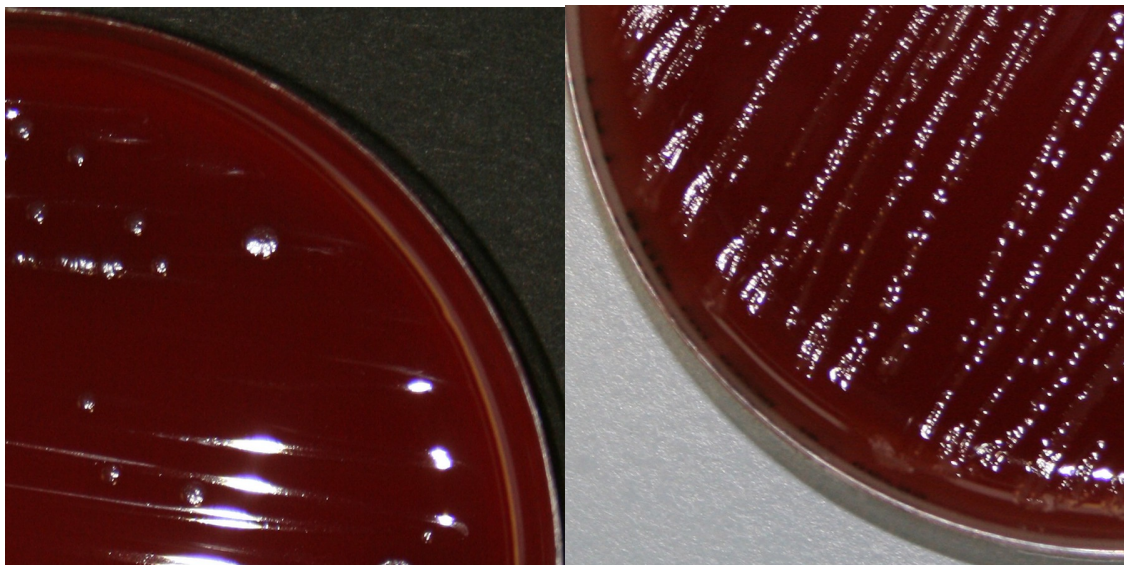


Abbildung 1: Wachstum von *A. butzleri* auf einem modifizierten Nährboden nach González et al. (2000)

*A. cryaerophilus* ist morphologisch ebenso wie *A. butzleri* beschaffen. Die Spezies wächst auf Müller-Hinton-Agar, einem Agar zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, in 0,5 mm großen, runden, glänzenden, flach bis flach-konvexen und weiß-gelblichen Kolonien (Houf et al., 2001B). Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 28 °C unter mikroaeroben Bedingungen (Neill et al., 1985). Kiehlbauch et al. (1991B) konnten in DNA-Hybridisierungsstudien nachweisen, dass zwei Subtypen von *A. cryaerophilus* existieren: Subtyp 1A und 1B. Subtyp 1B konnte insbesondere im Zusammenhang mit Infektionen beim Menschen nachgewiesen werden (Kiehlbauch et al., 1991B; On et al., 1995; Hsueh et al., 1997; Tee et al., 1988; Vandenberg et al., 2004). Anhand der positiven Katalasereaktion, dem Wachstum auf MacConkey-Agar und der Resistenz gegenüber Cadmiumchlorid lässt sich *A. cryaerophilus* Subtyp 1B von anderen Spezies differenzieren (Kiehlbauch et al., 1991B).

Die dritte bisher bekannte mit Erkrankungen beim Menschen assoziierte Spezies *A. skirrowii* ist aufgrund seines Wachstums, wie aber auch seiner biochemischen Eigenschaften, von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* unterscheidbar. So sind die Kolonien stecknadelkopfgroß, flach bis konvex, beige und grau und zeigen in den biochemischen Reaktionen ein starkes positives Ergebnis für die Katalase- und die Oxidase-Reaktion. Des Weiteren kann *A. skirrowii* auf Blutagar eine Hämolyse zeigen (Vandamme et al., 1992B). Trotz dieser Unterscheidungsmerkmale bleibt anzunehmen, dass aufgrund von Wachstumsverdrängung durch *Arcobacter* spp. die tatsächliche Kolonienanzahl von *A. skirrowii* unterschätzt wird (Wesley, 1997).

Wie zuvor aufgezeigt, stellt die Identifizierung und Klassifizierung von *Arcobacter* und verwandten Organismen eine Herausforderung, sowohl aufgrund seines biochemisch inerten Verhaltens, wie aber auch seines komplexen Wachstumsverhalten, dar. On et al. (1996) interpretieren dies als einen Hinweis darauf, dass *Arcobacter* spp. auch in genügsamen Lebensräumen wachsen kann.

## **2 Bedeutung von *Arcobacter* bei Mensch und Tier**

Für das Krankheitsgeschehen bei Mensch und Tier scheinen ausschließlich *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* von Bedeutung zu sein (Kiehlbauch et al., 1991A, 1991B; Vandamme et al., 1992A, 1992B; On et al., 1995; Wesley, 1997; Phillips, 2001B, Houf et al., 2007). Aufgrund des Nachweises von *A. cibarius* im Tier wird ein Pathogenitätsrisiko für den Menschen angenommen (Houf et al., 2005). Da die Rolle als möglicher Infektions-

erreger dieser Spezies jedoch noch kontrovers diskutiert wird, soll hier nur auf das Infektionsgeschehen, verursacht durch *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*, eingegangen werden.

## 2.1 Das Vorkommen beim Tier

Obwohl *Arcobacter* spp. in zahlreichen tierischen Organismen vorkommen, zeigen Tiere meist keine klinische Symptomatik. Jedoch konnte in den letzten Jahren der Mikroorganismus vermehrt aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs isoliert werden. Somit ist für die Epidemiologie, sowie für das Krankheitsgeschehen des Menschen das Krankheitsbild beim Tier ebenfalls von Bedeutung. Zudem führte erst die kontinuierliche Verbesserung der Isolationstechniken in der Veterinärmedizin dazu, dass *Arcobacter* spp. als tierpathogener Erreger entdeckt wurde (Collins et al., 1996A; Lammerding et al., 1996; Zanetti et al., 1996).

In der Milchkuh- und Fleischrinderhaltung wurden Studien zum Vorkommen von *Arcobacter* durchgeführt. Hier wurde der Erreger in 14 % der fäkalen Proben gesunder Milchkühe gefunden. In der Hälfte der Proben konnte die Spezies *A. butzleri* nachgewiesen werden (Wesley et al., 2000). Auch Öngör et al. (2004) konnten die Präsenz von *Arcobacter* spp. in Kotproben von klinisch gesunden Fleischrinderrassen mit verschiedenen Isolationsverfahren und anschließender Identifizierung der Isolate bestätigen. Aus fäkal entnommenen Proben konnten *Arcobacter* spp. in 39 % der Rinderproben isoliert werden. Auch aus Kotproben gesunder Schweine, Hühner, Schafe, Ziegen und Pferde konnten *Arcobacter* nachgewiesen werden (Kabeya et al., 2004; van Driessche et al., 2003, 2005). *A. butzleri* stellte sich als dominierende Spezies heraus. In geringeren Zahlen konnten *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* gefunden werden (Wesley et al., 2000; Kabeya et al., 2004; Öngör et al., 2004).

Da die Ernährung der Tiere, die Art der Fütterung, Futterergänzungsmittel und die Verwendung von probiotischen Bakterien oder Hefen einen Einfluss auf die Populationsdynamik von enterischen Pathogenen wie *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enterica* und *Campylobacteriaceae* haben, untersuchten Wesley et al. (2000) die Schutzfunktion der Verfütterung von Luzernen gegen eine hohe Kolonisation der Tiere mit *Arcobacter* spp. Sie fanden heraus, dass die Fütterung von Luzerne bei Rindern eine schützende Funktion hat. Die Prävalenz von *Arcobacter* spp. war bei laktierenden Kühen, die als Ergänzung mit

Brauerei-Produkten gefüttert wurden, niedriger als bei Kühen ohne Ergänzung (Wesley et al., 2000).

Da *Arcobacter* häufig bei klinisch gesunden Tieren nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass nur einige *Arcobacter* spp. als Krankheitserreger bei Tieren in Frage kommen (Ho et al., 2006). *A. nitrofigilis* und *A. halophilus* sind als mögliche Krankheitserreger nicht von Bedeutung (Vandenberg et al., 2004; Donachie et al., 2005). *A. cryaerophilus* zeigt sich uneinheitlich. Aufgrund von Untersuchungen bei Abortgeschehen in Sauen, wie aber auch von Vaginalabstrichen von unfruchtbaren Sauen, wird vermutet, dass nur *A. cryaerophilus* 1B pathogen ist. So fanden Lehner et al. (2005) eine deutlich verminderte Konzeptionsrate bei Sauen nach der experimentellen Infektion dieser Tiere. Auch die Erkrankungen beim Menschen werden ausschließlich mit *A. cryaerophilus* 1B in Zusammenhang gebracht (Tee et al., 1988; Vandenberg et al., 2004).

Das Bakterium *Arcobacter* wurde vor allem mit Erkrankungen bei Tieren, wie z. B. Abort, Mastitis und Diarrhöen, assoziiert (Wesley, 1996A; de Oliveria et al., 1997). *Arcobacter* spp. wurden häufiger in Geflügelhaltungen als bei Schweinen oder Rindern nachgewiesen. In diesen Tieren wurden vor allem *A. butzleri* als wichtigste Art, aber auch *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* gefunden (Skirrow, 1994; Andersen et al., 2007; Lipman et al., 2008). *A. cibarius* wurde ebenfalls bei Tieren nachgewiesen, jedoch wird das Pathogenitätspotential dieser Spezies beim Tier noch kontrovers diskutiert. Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens in Proben aus dem Lebensmittelhandel und bei menschlichen Erkrankungen, werden diese drei Spezies als sehr bedeutsam für das Infektionsgeschehen beim Menschen angesehen (Wesley, 1997; Phillips, 2001B; Lehner et al., 2005).

*Arcobacter* wurde nicht nur bei erkrankten Nutztieren nachgewiesen. Auch bei Hunden, bei Wildtieren und bei Exoten sind *Arcobacter* spp. zu finden (Lehner et al., 2005; Houf et al., 2008). *A. butzleri* wurde in nicht-menschlichen Primaten-Populationen gefunden (Anderson et al., 1993). Auch bei einem Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), bei dem eine chronische Diarrhöeform festgestellt wurde, konnte *A. butzleri* nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde keine der Kontaktpersonen infiziert, obwohl der Affe die Symptome über einen Zeitraum von zehn Monaten zeigte (Higgins et al., 1999). Hamir et al. (2004) berichteten von einer in Amerika durchgeführten Untersuchung, bei der bei Waschbären *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden konnte. Die Waschbären zeigten Darmentzündungen. *Arcobacter* spp. konnte in sechs von zehn untersuchten Tierproben mit Anreicherung und anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Harmon und Wesley (1996, 1997) nachge-

wiesen werden. Aufgrund der zahlreichen Verbreitung von Waschbären in den USA lösten diese Daten Bedenken für die öffentliche Gesundheit aus (Hamir et al., 2004).

Lammerding et al. (1996) berichtete, dass *A. butzleri* aus 25 verschiedenen Tierkörperpartien von Hühnern nachweisbar waren. Bei Atabay und Corry (1997) waren 121 von 125 Hühnerkadavern *Arcobacter* spp. positiv. Diese sehr hohen Nachweiszahlen verdeutlichen das zahlreiche Vorkommen von *Arcobacter* beim Geflügel (Atabay und Corry, 1997). Die hohe Prävalenz dieser Bakterien auf Geflügelschlachtkörper kann von Bedeutung für die öffentliche Gesundheit sein. Ziel einer Studie nach Wesley und Baetz (1999) war es, die natürliche Verbreitung von *A. butzleri* beim Geflügel und seine fakultative Pathogenität in experimentell infiziertem Geflügel festzustellen. Hierbei konnten nur bei sehr wenigen der älteren Vögel *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Bei Küken zum Zeitpunkt 5 Tage nach der Inokulation konnten noch keine *A. butzleri* nachgewiesen werden (Wesley und Baetz et al., 1999). In einer anderen Studie nach Ridsdale et al. (1998) wurde Entenfleisch untersucht. Aus zwei verschiedenen Herden stammende gepoolte Entenfleischproben wurden auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. und *Campylobacter* spp. überprüft. Dabei konnte neben *C. coli*, *C. jejuni*, *C. upsaliensis*, auch *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* und *A. butzleri* aus dem Zäkuminhalt und von den Kadavern der Tiere isoliert werden. Allerdings waren die Isolate nicht in der Lage bei 42°C zu wachsen. Diese Temperatur entspricht der ungefähren Körpertemperatur von Enten und folglich wird angenommen, dass *Arcobacter* spp. nicht zur normalen zäkalen Mikroflora gehört (Ridsdale et al., 1998).

## **2.2 Das Vorkommen beim Menschen**

Es existieren nur wenige Fallberichte über *Arcobacter* Infektionen beim Menschen. Im Allgemeinen zeigt das Krankheitsbild beim Menschen einen milden Verlauf. Nur selten wurden schwere Krankheitsverläufe beschrieben. Klinisch tritt die Infektion von *Arcobacter* spp. mit abdominalen Krämpfen und Durchfällen auf (Taylor et al., 1991; Vandenberg et al. 2004). Hierbei ist *A. butzleri* der am häufigsten vorkommende Erreger. Das Bakterium wurde zum ersten Mal in 2,4 % der klinischen Proben von 631 thailändischen Kindern mit Durchfall isoliert (Taylor et al., 1991). Ein Ausbruch von wiederkehrenden abdominalen Krämpfen und Durchfällen bei zehn kleinen Kindern in Italien war ebenfalls auf eine Infektion mit *A. butzleri* zurückzuführen (Vandamme et al., 1992A). Untersuchungen von menschlichen Kotproben bei erkrankten Patienten wiesen *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* nach. Innerhalb dieser Untersuchungen konnten *Arcobacter* spp. als

vierthäufigster *Campylobacter*-ähnlicher Organismus identifiziert werden (Vandenberg et al. 2004; Prouzet-Maulèon et al. 2006).

Des Weiteren konnten *Arcobacter* Arten bei Bakteriämie von Neonaten (On et al., 1995), bei Leberzirrhose (Yan et al., 2000) und bei akuter Blinddarmentzündung (Lehner et al., 2005) nachgewiesen werden. In einer Studie von Vandenberg et al. (2004) traten rektale Blutungen, sowie entzündliche Exsudate, deutlich weniger häufig bei Infektionen mit *A. butzleri* auf, als bei Infektionen hervorgerufen durch andere mit Erkrankungen beim Menschen assoziierte Spezies. Verglichen zu Infektionen hervorgerufen durch *C. jejuni*, stehen Infektionen mit *A. butzleri* häufiger in Verbindung mit einem anhaltenden und wässrigen Durchfall, jedoch seltener mit blutigem Durchfall (Vandenberg et al., 2004). Zwei Arten, *A. butzleri* und seltener *A. cryaerophilus*, wurden beim Menschen mit Enteritis und Bakteriämie gefunden. In einem Fall wurde *A. butzleri* bei einem Menschen mit Bakteriämie und akuter Blinddarmentzündung isoliert (Kiehlbauch et al., 1991A; On et al., 1995; Hsueh et al., 1997; Lau et al., 2002). Hsueh et al. (1997) konnten eine Infektion mit *A. cryaerophilus* Subtyp 1B bei einem Patienten nachweisen. Aufgrund der schweren klinischen Symptomatik, sowie der unspezifischen Symptome, weisen die Autoren auf den invasiven Charakter dieses Mikroorganismus, wie aber auch die Notwendigkeit hin, bei immunsupprimierten Patienten mit einer auftretenden Bakteriämie und Pneumonie eine Infektion mit *A. cryaerophilus* Subtyp 1B in Betracht zu ziehen.

Eine dritte Art, *A. skirrowii*, wurde von einer Person mit chronischem Durchfall isoliert (Wybo et al., 2004). Trotz dieser gelegentlichen Berichte ist vieles über den Erreger *Arcobacter* spp. in seiner Bedeutung als Durchfallerreger für die menschliche Spezies noch unklar (Lehner et al., 2005).

In jüngerer Zeit ergab eine belgische Studie, dass 3,5 % der *Campylobacter* spp. und weiteren damit verwandten Organismen, die über einen 8-Jahres-Zeitraum aus menschlichen Proben isoliert wurden, *A. butzleri* waren (Vandenberg et al., 2004). Manche Infektionen wurden im Zusammenhang mit intestinalen Störungen gemeldet, die denjenigen, die durch *C. jejuni* verursacht werden, ähnelten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Prävalenz dieser Erreger bislang aufgrund unzureichender kultureller Anzuchtbedingungen und / oder falscher Identifikation erheblich unterschätzt wurden (Lehner et al., 2005).

Zur Beurteilung des Verlaufs der klinischen Erkrankung, die Patienten mit einer *A. butzleri* Infektion zeigen, wurden in einer groß angelegten Klinikstudie Fallberichte von Patienten

erfasst (Vandenberg et al., 2004). Die Anamnese, das Alter, das Geschlecht und der Behandlungsstatus (ambulant oder stationär) wurden erfasst. Der klinische Status der Patienten wurde noch Monate nach der Behandlung erfasst. Bei den untersuchten Stuhlproben der Patienten war *A. butzleri* die am häufigsten isolierte Spezies. Des Weiteren konnte auch *A. cryaerophilus* nachgewiesen werden, jedoch nicht *A. skirrowii*. (Vandenberg et al., 2004).

Prinzipiell handelt es sich bei einer Infektion mit *Arcobacter* um ein selbstlimitierendes Krankheitsbild; die Therapie richtet sich nach den allgemein gültigen Richtlinien zur Behandlung einer Diarrhöe, wobei dem Ersatz von Flüssigkeit und Elektrolyten die oberste Priorität zukommt. Nur in wenigen Fällen, wie bei Vorliegen einer entsprechenden Grundkrankheit, bei ganz jungen oder alten Patienten oder chronisch-rezidivierendem Verlauf, ist eine antimikrobielle Therapie gerechtfertigt. Als Mittel der Wahl gelten Makrolide, wie z. B. Erythromycin und Clarithromycin oder Gentamycin (Son et al., 2007A), während Gyrasehemmer nur nach entsprechender Resistenztestung und nicht bei Kindern eingesetzt werden sollten (Kiehlbauch et al., 1992; Maxwell, 1997; Houf et al., 2001A; Vandenberg et al., 2006). Gegen Penicilline war *A. butzleri* in einer Studie zu 100 % resistent (Atabay und Aydin, 2001).

### **3 Pathomechanismen und Virulenzfaktoren**

Bisher ist nur wenig über die Pathogenitätsmechanismen von *Arcobacter* spp. bekannt. In-vitro-Versuche wurden an Zellmodellen wie INT 407-, HEp-2-, CHO-, HeLa- und Vero-Zellen durchgeführt. Es scheint klar zu sein, dass es zu zellschädigenden Effekten aufgrund von Zellelongation und Vakuolenbildung innerhalb der Zelle kommt (Fernández et al., 1995; Musmanno et al., 1997; Johnson und Murano, 2002; Villarruel-Lopez et al., 2003).

Johnson und Murano (2002) konnten in einer Untersuchung von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* aus Tier-, Human- und Umweltproben kein CDT (Cytolethal Distending Toxin) oder *cdt* Gene nachweisen. CDT ist ein Zelltoxin, welches bei *Campylobacter*, *Helicobacter* und anderen Erregern nachgewiesen werden konnte. Das Toxin wird von drei benachbarten Genen *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* kodiert. Letztlich führt dieses Toxin zur Apoptose der Zellen.

In-vivo-Pathogenitätsstudien an neugeborenen Ferkeln zeigten, dass die Verabreichung von *Arcobacter* spp. bei den Tieren zur Infektion innerer Organe führen kann (Wesley et al.,

1996B). Versuche an Hühner- und Putenküken zeigten, dass nicht zwangsläufig die Verabreichung von *Arcobacter* spp. isoliert aus Krankheitsmaterial zu einer Vermehrung oder sogar Infektion der Küken führen muss. Den Pathomechanismus der *Arcobacter* konnten diese Versuche nicht erklären (Wesley et al., 1995, Wesley und Baetz, 1999).

#### **4 Infektionsquellen und Übertragung**

Als Reservoir für *Arcobacter* spp. wird insbesondere das Geflügel gesehen (Lehner et al., 2005). Aber auch die Haltung von Schweinen, Schafen, Ziegen und Rindern in großen Verbänden auf engem Raum kann als Reservoir für *Arcobacter* gesehen werden (Atabay et al., 1998B; Golla et al., 2002; Houf et al., 2002B; Prouzet-Maulèon et al., 2006). Die Prävalenz von *Arcobacter* spp. bei Rindern zeigt sich saisonal als bimodaler Trend mit fäkaler Ausscheidung besonders im Frühjahr und im Herbst, was auch mit dem Vorkommen humaner Erkrankungen korreliert (Wesley et al., 2000; Öngör et al., 2004). Dieser saisonale Trend kann unter anderem an der hohen fäkalen Ausscheidung von *Arcobacter* spp. im Tierreservoir abhängig von Einstallung und Tierverkauf, von äußeren Umwelteinflüssen oder an der Einwirkung einer gemeinsamen Quelle der Kontamination, wie z. B. Futter, liegen. So wurde auch eine mögliche Kontamination des Tierfutters in Zusammenhang mit dem Auftreten von Zugvögeln gesehen (Wesley et al., 2000; Öngör et al., 2004). In Versuchen bei Schweinen wurden unterschiedliche Altersgruppen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Prävalenz von *Arcobacter* progressiv mit dem Alter der Tiere ansteigt. Dies kann als eine mögliche Folge der längeren Exposition und anschließender Reinfektion angesehen werden. Auf der anderen Seite könnte diese Prävalenz ebenfalls ein Hinweis auf saisonale Schwankungen in dem Vorkommen von *Arcobacter* spp. bei Schweinen zeigen (Shroeder-Tucker et al., 1996; Suarez et al., 1997; van Driessche et al., 2004).

In der Umwelt sind manche Arten von *Arcobacter* noch bei 4 °C für bis zu drei Wochen im Kot, für vier Wochen im Wasser und fünf Wochen im Urin überlebensfähig (Wesley et al., 2000). Für die Übertragung der Erreger von Tier zu Tier sind diese tierischen Ausscheidungen von primärer Bedeutung, so auch für den Menschen (Lehner et al., 2005). Die Anwesenheit von *Arcobacter* spp. im Kot der Tiere ist als potentielle Gefahr für die Kontamination der Tierkörper während der Schlachtung zu betrachten (Pesce et al., 1993; Ho et al., 2008). Besonders die automatisierte Technik bei der Schlachtung und Verarbeitung von Geflügelfleisch wird als erhöhtes Verteilungsrisiko betrachtet (Lehner et



al., 2005). Als wichtigste Infektionsquelle für *Arcobacter* spp. beim Menschen wird rohes Fleisch angesehen. In zahlreichen Fleischproben von Geflügel, Schwein, Rind und Pferd konnten *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden (Lehner et al., 2005; Vindigni et al., 2007). Jedoch ist nur wenig über die Verbreitung von *Arcobacter* spp. in Schlachthöfen bekannt. Eine Untersuchung ergab, dass *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* zahlreich auf der Schlachtausrüstung vorkommen (Houf et al., 2003). Allerdings kann eine Kontamination von Geflügelfleisch durch die Schlachtausrüstung alleine nicht erklären, woher die hohen Nachweisraten ( $\log 2 - \log 3/g$  Hals mit Haut) in einer Studie bei belgischen Geflügelprodukten stammen. Es wird vermutet, dass außer der kontaminierten Schlachtausrüstung noch eine andere, unbekannte Quelle an Schlachthöfen vorhanden ist (Houf et al., 2003). Collins et al. (1996A, 1996B) lieferten Nachweiszahlen für *Arcobacter* spp. in Schweinefleisch nach dem Schlachtprozess, die je nach Stallherkunft zwischen 0 und 90 % lagen. Diese Zahlen lassen darauf schließen, dass durch Schlachtkörper, die mit einer hohen Anzahl an *Arcobacter* belastet sind, während des Schlachtprozesses und auch bei der späteren Zerlegung, weitere Tierkörper kontaminiert werden können. Dabei ist eine Umweltkontamination von einer möglichen Kreuzkontamination zu unterscheiden. Probleme können dann auftreten, wenn sich das Fleisch für Zuschnitte längere Zeit im Zerlegeraum befindet und die Lagertemperaturen nicht eingehalten werden. Das Zerlegen und Behandeln von Schweine-, Rind- und Geflügelfleisch auf denselben Schneidbrettern und die nicht sachgemäße, getrennte Lagerung können zu einer Kreuzkontamination führen. Dies ist möglicherweise ein Grund dafür, weshalb höhere Nachweisraten bei Fleisch aus dem Einzelhandel gefunden werden können als direkt am Tierkörper (Lehner et al., 2005; Andersen et al., 2007).

Es wird vermutet, dass Wasser eine wichtige Rolle bei der Übertragung von *Arcobacter* auf den Menschen spielen könnte (Festy et al., 1993; Jacob et al., 1993). Trinkwasser wurde als bedeutender Risikofaktor für den Erwerb von Durchfallerkrankungen durch *Arcobacter* spp. in Ländern ohne geeignete Trinkwasseraufbereitung angesehen (Musmanno et al., 1997). Verschiedene Studien berichteten über den Nachweis von *Arcobacter* spp. in Oberflächenwasser, Grundwasser, Abwasser und in Klärschlamm (Musmanno et al., 1997; Jacob et al., 1998; Rice et al., 1999; Stampi et al., 1999; Fera et al., 2004; Morita et al., 2004). Darüber hinaus zeigten Assanta et al. (2002) in ihrer Studie, dass *Arcobacter* spp. problemlos auf verschiedenen Wasserversorgungsrohroberflächen wie Edelstahl, Kupfer und Kunststoff überleben können. Eine Bildung von extrazellulären Fibrillen wurde besonders auf der Edelstahloberfläche beobachtet (Assanta et al., 2002). In Europa kann

aufgrund der Wasseraufbereitung ein Kontaminationsrisiko durch Trinkwasser vernachlässigt werden (Wesley 1996A, Jakob et al., 1998; Lehner et al., 2005). Über die Aufnahme von Rohmilch wäre eine Übertragung von *Arcobacter* auf den Menschen jedoch denkbar. So konnte *Arcobacter* spp. aus Rohmilchproben von an Mastitis erkrankten Rindern nachgewiesen werden (Logan et al., 1982). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist eher undenkbar und möglicherweise nur einmal vorgekommen. Dabei handelte es sich um einen Ausbruch von Bauchkrämpfen bei Schulkindern in Italien im Zusammenhang mit dem Nachweis von *A. butzleri*. Der Zusammenhang zwischen einer Ansteckung der Kinder untereinander und dem Erregernachweis wurde nicht bewiesen (Vandamme et al., 1992A; Lehner et al., 2005).

## **5 *Arcobacter* in Lebensmitteln**

*Arcobacter* wurden im Fleisch vom Pferd, Lamm, Rind, Schwein und vom Geflügel nachgewiesen (Wesley, 1997, 2000; Lehner et al., 2005; Pejchalová et al., 2008). Rohes Fleisch wird als eine wichtige Quelle für *Arcobacter* Infektionen beim Menschen angesehen (Tab 1). Besonders die Verzehrgeohnheiten vieler asiatischer Länder lassen auf ein hohes Infektionsrisiko schließen. Die asiatische Küche bietet viele rohe oder nur kurz gebratene Gerichte mit Fleisch an. Eine Kühlung des Fleisches vor der Zubereitung fehlt oft und die hygienischen Standards entsprechen nicht denen in Europa (Kabeya et al., 2003, 2004; Ho et al., 2006). Aber auch in Europa liegen die Nachweiszahlen für *Arcobacter* in rohem Fleisch teilweise sehr hoch (Lehner et al., 2005). In erhitzten Produkten aus Fleisch wurde bislang kein *Arcobacter* nachgewiesen. Über die Verteilung von *Arcobacter* spp. in Meeresfrüchten, Fisch, Käse und Wurst ist bisher sehr wenig bekannt. *Arcobacter* wurde in Muscheln nachgewiesen. Fischproben wurden untersucht und waren negativ (Maugeri et al., 2000; Romero et al., 2002; Lehner et al., 2005; Ho et al., 2006, Pejchalová et al., 2008). In Rohmilchproben von gesunden und an Mastitis erkrankten Kühen konnten *Arcobacter* nachgewiesen werden (Logan et al., 1982; Scullion et al., 2006). Da bislang in Lebensmitteluntersuchungseinrichtungen nicht routinemäßig auf *Arcobacter* untersucht wird, sind in Deutschland und auch international Daten über das tatsächliche Auftreten dieses potentiellen Erregers in Lebensmitteln weitgehend unbekannt. Darüber hinaus schränkt das Fehlen eines standardisierten Isolierungsprotokolls die Fähigkeit Felddaten zu vergleichen stark ein (Ohlendorf und Murano, 2002; Lehner et al., 2005; Rohder et al., 2007).

Tabelle 1: Übersicht zur Verbreitung von *Arcobacter* spp. in rohem Fleisch

Land	Probenart	Positive Anzahl % <i>Arcobacter</i>	Probenanzahl	Literatur
Australien	Geflügelfleisch	73	22	Rivas et al., 2004
Australien	Schweinefleisch	29	21	Rivas et al., 2004
Australien	Rindfleisch	2	-	Rivas et al., 2004
Belgien	Geflügelfleisch	71	51	Houf et al., 2000
Belgien	Geflügelfleisch	84	157	Houf et al., 2001B
Belgien	Geflügelfleisch	100	30	Houf et al., 2000
Belgien	Schweinefleisch	76	54	Houf et al., 2000
Deutschland	Geflügelfleisch	79	14	Mac et al., 2006
Deutschland	Geflügelfleisch	85	82	Bartholomä u. Naumann, 2006
Deutschland	Geflügelfleisch	37	103	Rohder et al., 2007
Deutschland	Schweinefleisch	10	67	Mac et al., 2006
Deutschland	Rindfleisch	4	75	Rohder et al., 2007
Frankreich	Geflügelfleisch	81	201	Marinescu et al., 1996
Großbritannien	Geflügelfleisch	100	15	Atabay et al., 1998
Italien	Geflügelfleisch	0	32	Zanetti et al., 1996
Italien	Geflügelfleisch	52	170	Harrab et al., 1998
Italien	Schweinefleisch	3,7	27	Zanetti et al., 1996
Japan	Geflügelfleisch	49	-	Morita et al., 2004
Japan	Geflügelfleisch	23	-	Kabeya et al., 2004
Japan	Schweinefleisch	7	-	Kabeya et al., 2004
Japan	Rindfleisch	2,2	-	Kabeya et al., 2004
Kanada	Geflügelfleisch	97	125	Lammerding et al., 1996
Mexiko	Geflügelfleisch	40	-	Villarruez-Lopez et al., 2003
Mexiko	Schweinefleisch	51,5	-	Villarruel-Lopez et al., 2003
Mexiko	Rindfleisch	28,8	-	Villarruel-Lopez et al., 2003
Niederlande	Geflügelfleisch	53	224	De Boer et al., 1996
Niederlande	Schweinefleisch	0,5	194	De Boer et al., 1996
Spanien	Geflügelfleisch	53	-	González et al., 2000
Thailand	Geflügelfleisch	100	-	Morita et al., 2004
Türkei	Geflügelfleisch	95	40	Atabay et al., 2003
USA	Geflügelfleisch	84	50	Johnson u. Murano, 1999
USA	Geflügelfleisch	19	100	Wesley u. Baetz, 1999
USA	Schweinefleisch	32	-	Ohlendorf u. Murano, 2002

Collins et al. (1996B, 1996B) entdeckte *Arcobacter* spp. in 89 % der untersuchten Schweinefleischproben, die aus einem Schlachthof in Iowa stammten. Eine zweite Untersuchung neun Monate später lieferte wieder Nachweiszahlen von 90 % der untersuchten Proben. Aber alle Proben stammten von der gleichen Schweineherde. Im Gegensatz dazu waren nur 5 % der insgesamt 120 Proben von vier anderen Schweineherden *Arcobacter* positiv. Es wurde nicht ermittelt, ob bestimmte Haltungsbedingungen im Erzeugerbetrieb oder die Hygienebedingungen während der Schlachtung die Prävalenz von *Arcobacter* spp. beeinflussten.

*Arcobacter*, wie *Campylobacter* spp, wurden häufiger bei Geflügelfleisch als bei anderen Fleischarten gefunden (Corry und Atabay, 2001; Ho et al., 2006). In Deutschland liegen die Nachweiszahlen nach Bartholomä und Naumann (2006) für Geflügelfleisch bei 85 %. Im benachbarten Frankreich wurde *Arcobacter* spp. bei 81 % der Geflügelschlachtkörper gefunden, und davon waren 50 % der Isolate *A. butzleri* (Marinescu et al., 1996). Rivas et al. (2004) untersuchten insgesamt 88 Hühner-, Schweine-, Rind- und Lammfleischproben. In 35 % der Proben wurden *Arcobacter* spp. nachgewiesen, wobei ausschließlich *A. butzleri* nachgewiesen wurde. Am häufigsten wurde dieses Bakterium aus Geflügelfleisch (73 %), gefolgt von Schweinefleisch (29 %), Rind- (22 %) und Lammfleisch (15 %) isoliert.

Manke et al. (1998) bestimmte die Prävalenz von *Arcobacter* in Separatorenfleisch. *A. butzleri* wurde hier in 80 der 100 Proben nachgewiesen. In einer Untersuchung nach González et al. (2000) wurde die Prävalenz von *Arcobacter* spp. in Hühnchenproben aus verschiedenen lokalen Supermärkten bewertet. *A. butzleri* wurde häufiger als andere *Arcobacter* spp. aus Geflügelfleisch isoliert. In einer anderen Untersuchung von Geflügelprodukten in Kanada wurde *A. butzleri* aus 97 % der Geflügelschlachtkörper von fünf verschiedenen Verarbeitungsanlagen nachgewiesen (Lammerding et al., 1996).

Die Überlebensfähigkeit des Erregers in Fleischerzeugnissen ist gering. Es konnte nachgewiesen werden, dass *A. butzleri* nur bis zum neunten Tag und *A. skirrowii* nur eine Woche in Mettwurst überlebensfähig ist (Mac et al., 2006). In mit *A. cryaerophilus* kontaminierten Würsten, zu deren Herstellung mit *A. butzleri* auf natürlichem Wege kontaminiertes Fleisch verwendet worden war, setzte sich ab den zweiten Tag *A. butzleri* gegenüber *A. cryaerophilus* durch. Bei der Kontrolle des Wachstums bei unterschiedlicher Starterkultur wurde festgestellt, dass die Starterkulturen verschiedener Herkunft und Zusammensetzung das Wachstum von *A. butzleri* in unterschiedlichem Umfang hemmen können (Mac et al., 2006).

Bartholomä und Naumann (2006) führten, in Anlehnung an die Methode von Houf et al. (2001B), quantitative Untersuchungen an 82 Proben roher Geflügelteilstücke mit Haut und 54 Hackfleischproben von Rind und Schwein auf das Vorkommen von *Arcobacter* spp. durch. Ihre Methode eignete sich zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*.

Die erhobenen Daten belegten eine hohe Kontaminationsrate von rohen Geflügelteilstücken mit *A. butzleri* und *A. cryaerophilus*. Bei vergleichbaren Untersuchungen aus dem Berliner Raum waren in 37 % der getesteten frischen Hähnchenkeulen und in 4 % des Rinderhackfleisches *Arcobacter* spp. nachzuweisen (Hildebrandt, 2004; Rohder et al., 2007).

In Studien des Bundesamtes für Risikobewertung (BfR) (Peters et al., 2006; Mac et al., 2006) wurde die Kontaminationsrate frischer Hähnchen- und Schweinefleischproben aus dem Einzelhandel mit *Arcobacter* spp. nach der Methode von Houf et al. (2001B) untersucht. Der Anteil an mit *Arcobacter* spp. kontaminierten Einzelhandelsproben betrug 10 % bei Schweine- und 79 % bei Hähnchenfleisch. Diese Ergebnisse bestätigten weltweite Studien vergangener Jahre, in denen nachgewiesen wurde, dass Hähnchenfleisch häufiger mit *Arcobacter* spp. kontaminiert war als Schweinefleisch (Marinescu et al., 1996; Johnson und Murano, 1999A; Houf et al., 2001B; Ohlendorf und Murano., 2002; Scullion et al., 2004).

## **6 Diagnostik von *Arcobacter***

Um ein sicheres Lebensmittel gewährleisten zu können, muss die bakterielle Belastung der Lebensmittel ermittelt werden. Hierfür stehen unter anderem kulturelle und molekularbiologische Verfahren, die Polymerasekettenreaktion (PCR), zur Verfügung. Während die kulturelle Anzucht meist zeit- und arbeitsaufwendig ist, bietet die PCR Methodik eine sehr präzise, eindeutige und schnelle Antwort (Scheu et al., 1998). Im Folgenden soll ein Überblick über die verschiedenen in der Literatur angewandten kulturellen und PCR Methoden gegeben werden.

### **6.1 Kulturelle Verfahren**

Ellis et al. (1977) gelang der erste erfolgreiche Nachweis von *Arcobacter* spp. auf Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris-Polysorbate-80 (EMJH-P80), einem halbflüssigen Me-

dium, das ursprünglich für den Nachweis von *Leptospira* spp. entwickelt wurde. Danach wurde das Bakterium erfolgreich auf nicht-selektiven Blutagarplatten und modifizierten Charcoal-Cefoperazon-Deoxycholate-Nährböden (mCCDA) nachgewiesen. Während *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* gut auf mCCDA wachsen, wirkt dieses Nährmedium inhibitorisch auf das Wachstum von *A. skirrowii* (Corry und Atabay, 1997). Um die Nachweisrate von *Arcobacter* spp. in Lebensmitteln zu optimieren, wurden verschiedene kulturelle Verfahren entwickelt. Für den Nachweis von *Arcobacter* in Geflügelfleischproben eignen sich die Nachweismethoden nach de Boer et al. (1996), nach Johnson und Murano (1999), nach González et al. (2000) und nach Houf et al. (2001B). Die Methoden setzen sich aus einem Anreicherungsverfahren und einem Ausstrich der bebrüteten Anreicherungsbouillon auf einen selektiven Nährboden zusammen (Tab. 2).

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene kulturelle Verfahren zum *Arcobacter*-Nachweis

Methode	Anreicherung		Isolierung	
	Bouillon	Inkubation	Medium	Inkubation
de Boer et al. 1996	<i>Arcobacter</i> selective broth (ASB)	Aerob, 24°C, 24-28 h	<i>Arcobacter</i> selective Medium (ASM)	Aerob, 24°C, 48-72 h
Johnson und Murano 1999	<i>Arcobacter</i> Johnson-Murano broth (JMB)	Aerob, 30°C, 48 h	Johnson and Murano (JM) agar	Aerob, 30°C, 48 h
González et al. 2000	<i>Arcobacter</i> broth + CAT <sup>a</sup> Supplement	Mikroaerob, 30°C, 16 h	Modified Cefsulodin-Iragasan-Novobiocin (mCIN) Agar mit CAT (mCIN/CAT)	Aerob, 30°C, 48-72 h
Houf et al. 2001	<i>Arcobacter</i> Houf broth (AHB)	Mikroaerob, 28°C, 24-48 h	<i>Arcobacter</i> Houf Medium (AHM)	Mikroaerob, 28°C, 24-72 h

<sup>a</sup> CAT= Cefoperazon, Amphotericin B, Teicoplanin

De Boer et al. (1996) supplementieren *Brucella*-Bouillon mit Piperacillin, Cefoperazon, Cycloheximid und Trimethoprim. Houf et al. (2001B) verwenden *Arcobacter* Bouillon bestehend aus Pepton, Hefeextrakt und Kochsalz mit den antimikrobiellen Zusätzen Amphotericin B, Cefoperazon, 5-Fluorouracil, Novobiocin und Trimethoprim. Johnson und Murano (1999b) verwenden ebenfalls *Arcobacter* Bouillon, die zugesetzten Supplemente variieren jedoch von denen der Methode nach Houf et al. (2001B). So supplementieren sie nur Cefo-

perazon und 5-Fluorouracil. Auch González et al. (2000) verwenden für ihre Anreicherung *Arcobacter* Bouillon. Sie ergänzen die Bouillon durch das CAT-Supplement, bestehend aus Cefoperazon, Amphotericin B und Teicoplanin. Die Bebrütung der Anreicherungsbouillons erfolgt unter aeroben Bedingungen für die Methoden nach de Boer et al. (1996) und nach Johnson und Murano (1999). In den Methoden nach González et al. (2000). und nach Houf et al. (2001B) erfolgt die Bebrütung unter mikroaeroben Bedingungen. Die Bebrütungs-dauer beträgt in der Methode nach González et al. (2000) 16 h, in den Methoden nach de Boer et al. (1996) und Houf et al. (2001B) 24 bis 48 h und in der Methode nach Johnson und Murano (1999) 48 h. Die Bebrütungstemperatur ist in der Methode nach de Boer et al. (1996) 24 °C, in der Methode nach Houf et al. (2001B) 28 °C und in den Methoden nach Johnson und Murano (1999) und González et al. (2000) 30 °C (Tab. 3).

Tabelle 3: Hemmstoffe von Anreicherungsbouillons und Bebrütungsbedingungen von *Arcobacter*

Methoden	Hemmstoffe	Konzentration	Atmosphäre	Temperatur	Zeit
de Boer et al. 1996	Piperacillin Cefoperazon Trimethoprim Cycloheximide	75,0 mg/l 32,0 mg/l 20,0 mg/l 100,0 mg/l	Aerob	24 °C	24- 48 h
Johnson und Murano 1999	Cefoperazon 5-Fluorouracil	32,0 mg/l 200,0 mg /l	Aerob	30 °C	48 h
González et al. 2000	Cefoperazon Amphotericin B Teicoplanin	8,0 mg/ml 10,0 mg/ml 4,0 mg/l	Mikroaerob	30 °C	16 h
Houf et al. 2001	Cefoperazon Trimethoprim Amphotericin B 5-Fluorouracil Novobiocin	16,0 mg/l 64,0 mg/l 10,0 mg/l 100,0 mg/l 32,0 mg/l	Mikroaerob	28 °C	24- 48 h

Für den Ausstrich der bebrüteten selektiven Anreicherungsbouillons auf Agarplatten werden Selektivnährböden verwendet (Tab. 4). De Boer et al. (1996) und Houf et al. (2001B) verwenden hierfür die gleiche Zusammensetzung wie für die Anreicherungsbouillons ihrer Methode unter dem Zusatz von Agar Technical No. 3. In der Methode nach

Johnson und Murano (1999) wird *Arcobacter* Bouillon mit Agar Technical No. 3 und dem Supplement Cefoperazon verwendet. González et al. (2000) verwenden als Selektivagar modifizierten Cefsulodin Iragasan Novobiocin Agar (mCIN) mit dem selektiven Supplement CAT. Während die Bebrütungsbedingungen und die Bebrütungstemperaturen die gleichen sind wie für die Anreicherungsbouillons dieser Methoden, variiert die Bebrütungsdauer. So beträgt das Zeitintervall für die Bebrütungsdauer für die Methode nach de Boer et al. (1996) 48-72 h, für die Methode nach González et al. (2000) 48-72 h und für die Methode nach Houf et al. (2001B) 24-72 h. Nur bei der Methode nach Johnson und Murano (1999) ist die Bebrütungsdauer der Agarplatten die gleiche wie für die Anreicherungsbouillon (Tab. 4).

Tabelle 4: Hemmstoffe von Selektivnährböden und Bebrütungsbedingungen von *Arcobacter*

Methoden	Hemmstoffe	Konzentration	Atmosphäre	Temperatur	Zeit
de Boer et al. 1996	Piperacillin Cefoperazon Trimethoprim Cycloheximide	75,0 mg/l 32,0 mg/l 20,0 mg/l 100,0 mg/l	Aerob	24 °C	48- 72 h
Johnson und Murano 1999	Cefoperazon 5-Fluorouracil	32,0 mg/l 200 mg/ml	Aerob	30 °C	48 h
González et al. 2000	Cefsulodin Iragasan Novobiocin 5-Fluorouracil Cefoperazon Amphotericin B Teicoplanin	4,0 mg/ml 4,0 mg/ml 2,5 mg/ml 24,0 mg/l 8,0 mg/ml 10,0 mg/ml 4,0 mg/l	Aerob	30 °C	48-72 h
Houf et al. 2001	Cefoperazon Amphotericin B 5-Fluorouracil Novobiocin Trimethoprim	16,0 mg/l 10,0 mg/l 100,0 mg/l 32,0 mg/l 64,0 mg/l	Mikroaerob	28 °C	24- 72 h

Der Zusatz der antimikrobiell wirkenden Supplemente zu den Anreicherungsbouillons und den Agarmedien dient der Wachstumshemmung der Begleitflora von biologischen Proben. Um ein selektives Wachstum von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* zu erzielen, eignet sich die Supplementierung von 5-Fluorouracil, Novobiocin, Amphotericin B, Trimethoprim und Cefoperazone, da alle drei der mit humanen Erkrankungsfällen assoziierten Spezies gegen diese antimikrobiell wirksamen Substanzen eine hohe Resis-



tenz aufweisen (Houf et al., 2001A). Eine vollständige Inhibition des Wachstums der Begleitflora ist jedoch auch mit diesen Supplementen nicht zu erreichen (Houf et al., 2001A). Eine Empfindlichkeit gegenüber Piperacillin und Cefoperazon zeigen *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* ab einer Konzentration von 64 µg/ml, wohingegen *A. butzleri* keine Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen aufweist (Houf et al., 2001A). Verglichen zu der Suszeptibilität von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* zeigt *A. skirrowii* die höchste Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Houf et al., 2001A).

## 6.2 Nachweisverfahren mit PCR

Für den Nachweis von *Arcobacter* spp. in verschiedenen Lebensmitteln entwickelten Harmon und Wesley (1996), Hurtado und Owen (1997), Marshall et al. (1999), Al Rashid et al., (2000), González et al. (2000) und Winters und Slavik (2000) ein Protokoll. Moreno et al. (2003) entwickelten ein Protokoll für den Nachweis von *Arcobacter* spp. in Wasser. Al Rashid et al. (2000) zielen mit ihrer PCR Methode auf das Gen *glyA*, ein hoch konserviertes Gen der Familie *Campylobacteriaceae*. Die DNA Amplifikate werden hier zur Identifikation mit speziesspezifischen Oligonucleotidsonden hybridisiert. Hurtado und Owen (1999) amplifizieren eine Gensequenz in der 23S rRNA. Hierbei werden neben *Arcobacter* spp. auch viele *Campylobacter* spp. identifiziert. Marshall et al. (1999) wählten Primer, die auf eine 1004 Basenpaar (bp) Sequenz in der 16S rRNA von *C. jejuni*, *A. butzleri* und *H. pylori* zielen. In den PCR Methoden nach Harmon und Wesley (1996), nach Winters und Slavik (2000) und nach González et al. (2000) werden verschiedene Gensequenzen in der 16S rRNA amplifiziert, die entweder *A. butzleri* als alleinige Spezies oder *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* identifizieren. Während die meisten der zuvor beschriebenen Methoden auf die Identifizierung von *Arcobacter* spp. gerichtet sind, stellt die Methode nach González et al. (2000) ein Screeningnachweis für das Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch dar. Hierfür wird die Geflügelfleischprobe in die Anreicherungsbouillon *Arcobacter* Bouillon eingewogen, bei 30 °C für 16 h unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet und auf Selektivagar ausgestrichen. Danach wird die bakterielle DNA für die PCR extrahiert. Der Amplifikationszyklus besteht aus 25 Zyklen, die wiederholt die drei Schritte Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation durchlaufen. Die Denaturierung erfolgt 1 min bei 94 °C, die Anlagerung 1 min bei 59 °C und die Elongation 1 min bei 72 °C. Ein Ergebnis liegt mit dieser PCR-Kultur-Methode innerhalb von 48 h vor.

### 6.3 Identifizierungsverfahren

Da eine alleinige Anzucht auf Agarmedien nicht ausreicht, um eine Bakterienspezies zu identifizieren, werden als Bestätigungsreaktion die phänotypischen Eigenschaften der gewachsenen Kolonien herangezogen. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, sind jedoch die von On et al. (1996) und Atabay et al. (1997) beschriebenen phänotypischen Eigenschaften von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* divergierend.

Tabelle 5: Phänotypische Differenzierung von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* (On et al., 1996; Atabay et al., 1997)

Phänotypischer Charakter	<i>A. butzleri</i>		<i>A. cryaerophilus</i>		<i>A. skirrowii</i>	
	Atabay	On	Atabay	On	Atabay	On
Katalase	97 <sup>a</sup>	33	93	99	100	99
TTC <sup>b</sup> -Reduktion	94	99	14	95	0	77
Nitrat-Reduktion	88	99	21	99	100	99
Selenit-Reduktion	29	01	0	01	0	11
Indoxyl-Acetat-Hydrolyse	100	99	100	00	50	99
Alpha-Hämolyse	50	01	7	01	100	99
Wachstum bei 37 °C (O <sup>2</sup> )	100	99	86	50	100	99
Wachstum bei 42 °C (mO <sup>2</sup> )	35	25	7	01	100	11
Wachstum anaerob	71	99	100	16	100	99
Wachstum anaerob mit TMAO <sup>c</sup>	71	99	86	11	100	01
Wachstum mit 2.0 % Gallensalz	100	99	50	79	100	99
Wachstum mit 2.0 % NaCl	100	92	93	84	100	99
Wachstum mit 4.0 % NaCl	15	1	1	1	100	99
Wachstum mit Nalidixicsäure	59	25	0	1	0	1
Wachstum mit Metronidazol	74	92	79	99	100	99
Wachstum mit Carbenicillin	100	99	100	99	50	99
Wachstum mit TTC (0.4 %)	94	99	38	95	0	99
Wachstum mit Fuchsin	6	99	0	68	0	01
Wachstum mit Kristallviolett	29	99	7	99	0	33
Wachstum mit Janusgrün	91	99	43	99	0	99
Wachstum mit Methylorange	100	99	93	99	0	99
Wachstum mit Natriumdeoxycholate	100	99	100	89	0	77
Wachstum mit Pyronin	68	17	0	01	0	1
Wachstum mit Tyrosine	94	50	14	01	0	1
Wachstum auf CCDA <sup>d</sup>	100	99	93	95	100	99

Wachstum auf MacConkey	100	83	14	16	0	1
------------------------	-----	----	----	----	---	---

<sup>a</sup> Alle Angaben in Prozent

<sup>b</sup> TTC= 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

<sup>c</sup> TMAO= Trimethylamine-N-oxid

<sup>d</sup> CCDA= *Campylobacter* Charcoal Deoxycholate Agar

Alle drei Spezies zeigen jedoch eine positive Katalasereaktion, ein Wachstum bei 37 °C unter aeroben Bedingungen, ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen und sie reduzieren alle Nitrat zu Nitrit. *A. butzleri* kann von den beiden anderen Stämmen durch seine vergleichsweise sehr schwache Katalasereaktion, die nach Zugabe von 6 % Wasserstoff erst nach 10 s auftritt, unterschieden werden.

Des Weiteren ist allen ein Wachstum bei dem Zusatz von 2 % Kochsalz möglich, während bei einem Zusatz von 4 % Kochsalz nur noch *A. skirrowii* wächst. Ebenso wachsen *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* auf dem Nährmedium CCDA, auf MacConkey-Agar wächst jedoch nur *A. butzleri*. Eine eindeutige Identifizierung der Spezies anhand dieser phänotypischen Merkmale ist somit schwierig. Eine wesentlich spezifischere Identifizierung der gewachsenen Bakterienkolonien ist mittels PCR möglich. Hierbei wird gezielt ein Fragment der DNA-Sequenz des Bakteriums amplifiziert. Der Einsatz von einem spezifischen Primer ermöglicht den Nachweis einer Spezies, während die Verwendung mehrerer Primerpaare mehrere Spezies gleichzeitig nachweisen kann. Dieses Vorgehen wird als Multiplex PCR (m-PCR) bezeichnet. Houf et al. (2000) entwickelten eine m-PCR für die Bestätigung von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Houf et al. (2002A) untersuchten mit ihrer Methode Geflügelprodukte und entdeckten hier eine große genetische Vielfalt von *Arcobacter* spp.

Für die Identifizierung von *Arcobacter* aus Geflügelfleisch eignet sich die Methode nach Houf et al. (2000), da sie bereits für Geflügelfleisch etabliert ist. Durch die Verwendung der m-PCR Methode nach Houf et al. (2000) war man in der Lage, die wichtigsten *Arcobacter* spp. sowohl für die Bestätigung der Kolonien von den Agarplatten, als auch aus der PCR Probe zu erkennen. Für den Sensitivitätsnachweis der PCR verwendete Houf et al. (2000) zwei verschiedene Anreicherungsbouillons, die für den Nachweis von *Arcobacter* spp. in Geflügelproben entwickelt worden waren. Die m-PCR wurde mit zwei Anreicherungen durchgeführt, um die Performance des Tests zu ermitteln. Die m-PCR wurde auch auf Bakterienkolonien, die von Blutagarplatten (Oxoid) stammten, eingestellt. Das Prinzip beruht auf Verwendung spezifischer Primer. Der spezifische ARCO-BUTZ-Primer amplifiziert ein 401-bp-Fragment und erwies sich als spezifisch für alle *A. butzleri*. Der

ARCO-SKIR-Primer amplifiziert ein spezifisches 641 bp Fragment für alle *A. skirrowii*. Für *A. cryaerophilus* wurden die Primer CRY, CRY1 und 2 verwendet. *A. cryaerophilus* ist bekannt als heterogene Art. Zwei Untergruppen wurden innerhalb dieser Arten mit DNA-Hybridisierung identifiziert. Die Primer-Kombination CRY 1 und CRY2 verstärkt ein spezifisches 257 bp Fragment für alle *A. cryaerophilus* Untergruppen.

## B Eigene Untersuchungen

### 1 Ziel der Arbeit

#### 1.1 Methodenvergleich

Zuerst sollen vier verschiedene kulturelle Nachweisverfahren und eine PCR Methode für einen optimalen Nachweis von *Arcobacter* spp. modifiziert werden.

#### 1.2 Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch

Die modifizierten kulturellen Verfahren und die PCR Methode sollen in einer Vergleichsstudie angewendet werden. Mit diesen Nachweisverfahren sollen Proben von Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen auf das Vorkommen von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* untersucht werden.

### 2 Material

#### 2.1 Herkunft der Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stammkulturen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Alle im Rahmen der praktischen Versuche verwendeten Bakterienstämme wurden über die Firma Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Tabelle 6: Verwendete Stammkulturen

Spezies	Stammkultur
<i>A. butzleri</i>	DSMZ 8739
<i>A. cryaerophilus</i>	DSMZ 7289
<i>A. skirrowii</i>	DSMZ 7302

#### 2.2 Probenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Probenahme im Zeitraum zwischen Januar 2006 und April 2007 durch Lebensmittelkontrolleure des Regierungsbezirks Karlsruhe. Zu der

Kategorie nichtverzehrfertige Erzeugnisse zählen insgesamt 146 frische Geflügelproben, die keinem Erhitzungsverfahren unterzogen worden waren. Vier Tierarten (Huhn, Pute, Gans, Ente) wurden untersucht (Tab. 7). Zur Kategorie verzehrfertige Erzeugnisse zählen insgesamt 63 Geflügelfleischerzeugnisse. Dieser Kategorie wurden diejenigen Proben zugeordnet, die einem Verarbeitungsverfahren unterzogen wurden und dadurch verzehrfertig waren. Dies waren ausschließlich aus Geflügelfleisch hergestellte Rohwürste wie z. B. Salami von Tierarten wie Pute oder Truthahn. Die Kategorie "Brühwürste" umfasste Erzeugnisse wie z. B. Fleischwurst, Geflügelwiener, Bierwurst, Bratwurst, Lyoner und Schinkenwürstchen. Unter Sonstiges wurde die Untersuchung einer Geflügelfrikadelle und eines Hähnchendöners zusammengefasst. Die meisten Proben stammten aus Einzelhandelsgeschäften. Einige Proben wurden auf Wochenmärkten, direkt bei Erzeugern (Bauernhöfe), oder aus der Schnellgastronomie gewonnen. In Tabelle 31 im Anhang sind alle Proben mit ihrer Herkunft aufgelistet.

Tabelle 7: Anzahl der untersuchten Geflügel und Geflügelfleischerzeugnissen

Nicht verzehrfertige Erzeugnisse					Verzehrfertige Erzeugnisse			
Huhn	Pute	Gans	Ente	Anzahl Proben	Roh-Wurst	Brüh-Wurst	Sonstige	Anzahl Proben
112	14	9	11	146	31	30	2	63

### 2.3 Untersuchungsmaterial

Die für den kulturellen und molekularbiologischen Nachweis verwendeten Nährmedien, Testsysteme, Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel sind im Anhang aufgeführt.

## 3 Methode

Zu Beginn der Untersuchungen wurden bei den vier aus der Literatur ausgewählten Anreicherungen und Nährmedien die Supplemente der antimikrobiellen Substanzen so verändert, dass sie optimal das Wachstum von *Arcobacter* fördern und die Begleitflora hemmen. Außerdem wurden die Isolierungsbedingungen und die Probenaufarbeitung der PCR nach González et al. (2000) verändert. Danach wurden mit den modifizierten Metho-

den die Geflügelfleischproben und die Geflügelfleischerzeugnisse auf das Vorhandensein von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* untersucht.

### **3.1 Kulturelle Nachweisverfahren**

Die ursprünglichen kulturellen Methoden sind im Literaturteil dargestellt. Im folgenden Text werden die vorgenommenen Veränderungen beschrieben.

#### **3.1.1 Modifikation der kulturellen Nachweisverfahren**

Zur Verbesserung der Selektivität der Anreicherungen und Nährböden wurden Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen zum Nährmedium gemischt, um Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *Arcobacter* feststellen zu können. Außerdem wurden die Anzuchtbedingungen der Anreicherungen und Nährböden wie Atmosphäre, Temperatur und Bebrütungszeit verändert. Die Zusammensetzung der Basisnährmedien ist die gleiche wie bei den Originalmethoden. Eine genaue Herstellungsanleitung ist im Anhang, Kapitel H, zu finden. Für die Modifikation der Anreicherungen und der selektiven Nährböden wurden von den drei Stammkulturen *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* nach deren Kultivierung für 48 h bei 30 °C mikroaerob auf Blutagar (Oxoid, Wesel, Deutschland) jeweils eine Kolonie entnommen und in jeweils 10 ml *Arcobacter* Bouillon (Oxoid) gegeben. Die Bouillons wurden für 16 h bei 30 °C mikroaerob bebrütet. So entstand je eine Stammkulturlösung der drei *Arcobacter* spp.

##### **3.1.1.1 Modifikation der kulturellen Anreicherungsverfahren**

Im Labor wurde in sechs Ansätzen zur Anreicherungsbouillon nach de Boer et al (1996) die antimikrobielle Substanz Cefoperazon in einem Gehalt von 50 mg/l, 32 mg/l und 16 mg/l und die Substanz Piperacillin in einem Gehalt von 100 mg/l, 75 mg/l und 32 mg/l zugemischt. In jeweils 10 ml Anreicherungsbouillon wurde 50 µl von jeweils einer der drei Stammkulturlösungen zugegeben. Ebenso wurde bei der Methode nach Houf et al. (2001B) mit der Substanz Amphotericin B mit einem Gehalt von 30 mg/l, 20 mg/l, 10 mg/l und 5-Fluorouracil mit einem Gehalt von 200 mg/l, 150 mg/l, 100 mg/l verfahren. Nach der Methode nach Johnson und Murano (1999) wurden die Substanzen Cefoperazon und 5-Fluorouracil in den oben beschriebenen Gehalten zugegeben. In drei Ansätzen zur

Methode nach González et al. (2000) wurde im ersten Ansatz nur CAT-Supplement (Oxid) bestehend aus Cefoperazon (8mg/l), Amphotericin B (10 mg/l) und Teicoplanin (4mg/l) zur Bouillon gegeben. Im zweiten Ansatz wurde zusätzlich zum CAT-Supplement (Oxid) 40 mg/l Novobiocin und 100 mg/l 5-Fluorouracil eingemischt. Im dritten Ansatz wurde zusätzlich 60 mg/l Novobiocin und 150 mg/l 5-Fluorouracil zugegeben. Jede Bouillon wurde zweimal hergestellt, so dass nach der Methode González et al. (2000) insgesamt 9 Bouillons vorbereitet wurden.

Die beimpften Bouillons nach de Boer et al. (1996), Houf et al. (2001) und Johnson und Murano (1999) wurden bei 30 °C mikroaerob bebrütet und nach 16, 24 und 48 h ausgewertet. Die beimpften Bouillons nach González et al. (2000) wurden einmal bei 30 °C mikroaerob bebrütet und in einem zweiten Versuchsansatz die beimpften Bouillons nach González et al. (2000) nach 16 h mikroaerober Bebrütung nochmals 24 h aerob bebrütet (Tab. 8).



Tabelle 8: Versuchsansätze und Anzuchtbedingungen der Anreicherungsbouillons

Methoden	Anreicherungsbouillon	Versuchsansatz	Anzuchtbedingungen
De Boer et al. 1996	<i>Arcobacter</i> selective broth (ASB)	1. Cefoperazon 50,0 mg/l 2. Cefoperazon 32,0 mg/l 3. Cefoperazon 16,0 mg/l 4. Piperacillin 100,0 mg/l 5. Piperacillin 75,0 mg/l 6. Piperacillin 32,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h
Johnson-Murano 1999	<i>Arcobacter</i> Johnson-Murano broth (AJMB)	1. Cefoperazon 50,0 mg/l 2. Cefoperazon 32,0 mg/l 3. Cefoperazon 16,0 mg/l 4. 5-Fluorouracil 200,0 mg/l 5. 5-Fluorouracil 150,0 mg/l 6. 5-Fluorouracil 100,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h
González et al. 2000	<i>Arcobacter</i> broth + CAT <sup>a</sup> Supplement (ABCAT)	Novobiocin 0 mg/ml 5-Fluorouracil 0 mg/ml	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h
		Novobiocin 40,0 mg/l Novobiocin 60,0 mg/l 5-Fluorouracil 100,0 mg/l 5-Fluorouracil 150,0 mg/l	16 h mikroaerob danach 24, 48 h aerob
Houf et al. 2001	<i>Arcobacter</i> Houf broth (AHB)	1. Amphotericin B 30,0 mg/l 2. Amphotericin B 20,0 mg/l 3. Amphotericin B 10,0 mg/l 4. 5-Fluorouracil 200,0 mg/l 5. 5-Fluorouracil 150,0 mg/l 6. 5-Fluorouracil 100,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h

<sup>a</sup> CAT= Cefoperazon 8,0 mg/ml, Amphotericin B 10,0 mg/ml, Teicoplanin 4,0 mg/ml

### 3.1.1.2 Modifikation der selektiven Nährböden

Im Labor wurden in sechs Ansätzen zu Nährböden nach de Boer et al (1996) die antimikrobielle Substanz Cefoperazon in einem Gehalt von 50 mg/l, 32 mg/l und 16 mg/l und die Substanz Piperacillin in einem Gehalt von 100 mg/l, 75 mg/l und 32 mg/l zugemischt. Auf die Agarplatten wurde mit dem Spiralplater (Spiral Biotech, Norwood, USA) jeweils 50 µl der drei Stammkulturlösungen aufgetragen. Es wurden alle drei Stammkulturen auf den Nährböden getestet, so dass insgesamt 18 Nährböden vorbereitet wurden. Ebenso wurde bei der Methode nach Houf et al. (2001) mit der Substanz Amphotericin B mit einem Gehalt von 30 mg/l, 20 mg/l, 10 mg/l und 5-Fluorouracil mit einem Gehalt von 200 mg/l, 150 mg/l, 100 mg/l verfahren. Die Methode nach Johnson und

Murano (1999) wurde nicht durchgeführt, da hier als antimikrobielle Zusätze Cefoperazon und 5-Fluorouracil verwendet wurden, und diese Substanzen bereits in den Nährböden nach de Boer et al. (1996) und nach Houf et al. (2001) getestet wurden. In vier Ansätzen zur Methode nach González et al. (2000) wurden die Substanzen NaCl 1,5 mg/l, 0,8 mg/l und 5-Fluorouracil 200 mg/l, 100 mg/l getestet. Jede Agarplatte wurde zweimal hergestellt, so dass nach der Methode González et al. (2000) insgesamt acht Agarplatten vorbereitet wurden.

Die mit dem Spiralplater (Spiral Biotech) beimpften Nährböden nach de Boer et al. (1996) und Houf et al. (2001) wurden bei 30 °C mikroaerob bebrütet und nach 16, 24 und 48 h ausgewertet. Die beimpften Nährböden nach González et al. (2000) wurden im ersten Versuchsansatz bei 30 °C mikroaerob bebrütet und im zweiten Versuchsansatz nach 16 h mikroaerober Bebrütung nochmals für 24 h aerob bebrütet (Tab. 9).

Tabelle 9: Versuchsansätze der Nährböden

Methoden	Medium	Versuchsansatz	Anzuchtbedingungen
De Boer et al. 1996	<i>Arcobacter</i> selective medium (ASM)	1. Cefoperazon 50,0 mg/l 2. Cefoperazon 32,0 mg/l 3. Cefoperazon 16,0 mg/l 4. Piperacillin 100,0 mg/l 5. Piperacillin 75,0 mg/l 6. Piperacillin 32,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h
González et al. 2000	Modified cefsulodin-iragasan-novobiocin (mCIN) agar mit CAT (mCIN/CAT)	1. NaCl 1,5 mg/l 2. NaCl 0,8 mg/l 3. 5-Fluorouracil 200,0 mg/l 4. 5-Fluorouracil 100,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C, 16 h danach Aerob, 30 °C, 24, 48 h
Houf et al. 2001	<i>Arcobacter</i> Houf medium (AHM)	1. Amphotericin B 30,0 mg/l 2. Amphotericin B 20,0 mg/l 3. Amphotericin B 10,0 mg/l 4. 5-Fluorouracil 200,0 mg/l 5. 5-Fluorouracil 150,0 mg/l 6. 5-Fluorouracil 100,0 mg/l	Mikroaerob, 30 °C 16, 24, 48 h

<sup>a</sup> CAT= Cefoperazon 8,0 mg/ml, Amphotericin B 10,0 mg/ml, Teicoplanin 4,0 mg/ml

### 3.1.2 Untersuchungsablauf der kulturellen Nachweisverfahren

Nach den Modifikationen der Anreicherungen und selektiven Nährböden wurden die vom Geflügel stammenden Laborproben untersucht. Die Isolierung von *Arcobacter* erfolgte mit

vier verschiedenen modifizierten kulturellen Verfahrenstechniken. In Abbildung 2, Anhang H, sind die einzelnen kulturellen Verfahrenstechniken anhand eines Fließdiagramms dargestellt.

### **3.1.2.1 Probenvorbereitung und Anreicherungs-schritte**

Zur Anreicherung wurden 40 g Probenmaterial steril entnommen, klein geschnitten und zusammen mit 120 ml der Anreicherungsbouillon in einem Stomacherbeutel gemischt (1:4 Verdünnung). Bei der Materialauswahl wurde darauf geachtet, vorhandene Hautanteile zu verwenden. Das Material wurde für 1 min mit der Bouillon in einem Stomacher durchmischt. Dann wurden die Proben zusammen mit der Anreicherungsbouillon in Reagenzgefäße abgefüllt und mit Alufolie verschlossen. Die Bebrütung fand bei der Methode nach de Boer et al. (1996) unter mikroaeroben Bedingungen für 48 h bei 30 °C statt, bei der Methode nach Houf et al. (2001) ebenfalls mikroaerob für 48 h bei 30 °C. Die Bebrütung fand bei der Methode nach Johnson und Murano (1999) bei 30 °C aerob statt. Nach der Methode nach González et al. (2000) wurden die Proben zuerst 16 h mikroaerob und dann weitere 24 h aerob bebrütet. Die Inkubation erfolgte unter mikroaeroben Bedingungen in einem Anaerobiertopf mit CampyGen™ (Oxoid).

### **3.1.2.2 Anzuchtverfahren auf Selektivplatten und weitere Kultivierung (Subkulturen)**

Nach den Bebrütungszeiten der Anreicherungen wurde ein Inokulum von jeweils 1 ml auf die entsprechenden Selektivplatten mit dem Spatelverfahren verteilt. Zur Wachstumskontrolle wurde auch eine Blutagarplatte mit der Stammkultur *A. butzleri* (DSMZ 8739) beimpft. Die Proben wurden nach der Methode von de Boer et al. (1996) bei 30 °C mikroaerob, von Houf (2001) bei 30 °C mikroaerob, von Johnson und Murano (1999) bei 30 °C aerob und von González et al. (2000) bei 30 °C mikroaerob und aerob bebrütet. Nach jeweils 24, 48, und 72 h wurden die Nährböden ausgewertet. Verdächtige Kolonien wurden entnommen und zur weiteren Anzucht auf der Methodenentsprechenden Selektivplatte und einer TSA Platte mikroaerob bei 30 °C für bis zu 48 h weiter kultiviert. Bei keinen oder unzureichenden Wachstumserfolgen wurden die Agarplatten weitere 24 - 48 h bebrütet und dann entsprechend weiterbehandelt. Nur verdächtige Subkulturen in Reinkultur wurden für die weitere Differenzierung mit genotypischen Verfahren bearbeitet (Abschnitt C, Kapitel 3.2.4).

### 3.2 PCR-Nachweisverfahren

Für die Modifikation der PCR Methode nach González et al. (2000) wurden die *Arcobacter* Stämme von *A. butzleri* (LMG 8739), *A. cryaerophilus* (LMG 7289) und *A. skirrowii* (LMG 7302) verwendet.

#### 3.2.1 Modifikation der Anreicherung für die PCR Methode

González et al. (2000) verwendete für ihre Anreicherung *Arcobacter* Bouillon (Oxoid) mit Cefoperazon, Amphotericin B und Teicoplanin. In dieser Studie wurde die modifizierte Anreicherung nach González et al. (2000) verwendet. Hier wurden zusätzlich zum CAT-Supplement (Oxoid) die antimikrobiellen Substanzen 5-Fluorouracil (100 mg/l) und Novobiocin (40 mg/l) verwendet. Die Bouillon wurde mikroaerob bei 30 °C für 16 h bebrütet.

#### 3.2.2 Modifikation der DNA-Probenaufreinigung

Um für die PCR Analyse optimale Bedingungen zu erreichen, wurden in Vorversuchen zwei verschiedene DNA-Probenaufreinigungsverfahren getestet. In beiden Aufarbeitungsmethoden wurden die Bakterienkulturen gelöst, die DNA isoliert und inhibitorische Faktoren entfernt. Somit wurde versucht, die Nachweisrate durch die Durchführung einer sehr aufwändigen DNA-Probenaufreinigung zu erhöhen. Dafür wurde eine Methode nach González et al. (2000) verwendet. Die andere Methode zur DNA-Probenaufreinigung ist die PrepMan™-Methode (Applied Biosystems 2002, Foster City CA, USA).

Die Bakterienstämme wurden auf Blutagarplatten (Oxoid) und TSA Platten bei 30 °C für 48 h mikroaerob bebrütet. Von der Blutagarplatte wurde je eine Kolonie entnommen und in 5 ml einer *Arcobacter* Bouillon gegeben. Diese Bouillon wurde 16 h bei 30 °C mikroaerob bebrütet. Ein ml dieser Bouillon wurde in einer Verdünnungsreihe bis  $10^{-4}$  mit 9 ml Pepton-NaCl vermischt. Dann wurde von dieser Lösung wieder 1 ml entnommen und zu 9 ml Pepton-NaCl gegeben. Dieser Vorgang wurde noch dreimal durchgeführt. In Reagenzgläsern wurden achtmal 10 g Geflügelfleisch mit 90 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) vermischt. Von der Verdünnung  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  wurde jeweils 1 ml entnommen und zur TSB gegeben. Von jedem Stamm wurden vier Versuchsansätze vorbereitet. Negative Kontrollen wurden bei jedem Experiment mitgeführt. Eine Anreicherung wurde für 48 h bei 30 °C

durchgeführt. Von jeder Probe wurde 1 ml in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die zwei Aufreinigungsmethoden durchgeführt.

Beim Vorgang der Aufarbeitungsmethode nach González et al. (2000) wurde zum Mikrozentrifugenröhrchen 1 ml steriler phosphat-gepuffertes Salz (PBS) zugegeben, die Lösung gevortexed und bei 12000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang nochmals wiederholt. Der bleibende Überstand wurde wieder verworfen und das gewaschene Fleischpellet wurde mit 25 µl einer 5,9 M Guanidinthiocyanatlösung (GITC) gevortexed und im Wasserbad bei 60 °C für 90 min erhitzt.

Die Lösung wurde durch Zugabe von ca. 0,2 ml InstaGene (Bio-Rad, München, Deutschland) und ca. 0,26 ml steriles, destilliertes Wasser auf ca. 0,3 mol/l eingestellt, danach vermischt und bei 95 °C im Wasserbad für 8 min erhitzt. Die Lösung wurde für 40 min auf Raumtemperatur abgekühlt und Natriumacetat zugefügt, bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mol/l. Danach wurde die Probe bei 12000 g für 10 min zentrifugiert, auf 4 °C heruntergekühlt, der flüssige Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zweimal wurde mit der gleichen Menge an Chloroform die Probe gewaschen, schließlich die ausgefallene DNA mit einem Tropfen 95 % Ethanol vermischt und bei 12000 g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der DNA-Rückstand mit 50 µl sterilem destilliertem Wasser resuspendiert. Die Primer wurden wie im später beschriebenen PCR Screening-Verfahren nach González et al. (2000) verwendet und mit jeder Probe eine DNA Amplifikation und Auswertung durchgeführt.

Für die Aufarbeitung nach der PrepMan™-Methode (AB, 2002) wurden die gleichen Bakterienstämme und die gleiche Bouillon (AB) verwendet wie für die Aufarbeitung nach González et al. (2000). Von der Bouillon wurde 1 ml in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und die Probe für 3 min bei 16000 g zentrifugiert. Der flüssige Überstand in den Röhrchen wurde verworfen und 200 µl von PrepMan™-Reagenz hinzugegeben und das verschlossene Röhrchen für 10 - 30 s gevortexed. Danach wurde die Probe in einem Wasserbad für 10 min bei 100 °C erhitzt. Nach dem Zentrifugieren der Probe für 3 min bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die für die PCR bereite Probe wurde bis zur Weiterbehandlung bei 4 °C gekühlt. Die Primer, Amplifikation- und Gelelektrophoresebedingungen und Abläufe wurden wie bei dem PCR Screening-Verfahren nach González et al. (2000) gewählt und mit jeder Probe eine DNA Amplifikation und Auswertung durchgeführt.

### 3.2.3 Untersuchungsablauf PCR-Screening

In Abbildung 3 im Anhang ist der Arbeitsablauf der modifizierten PCR nach González et al. (2000) dargestellt.

#### 3.2.3.1 Vorbereitung der Geflügelproben / Anreicherungsverfahren

Für die Anreicherung wurde das modifizierte Verfahren nach González et al. (2000) verwendet. Zur Anreicherung wurden 40 g Probenmaterial steril entnommen, klein geschnitten und zusammen mit 120 ml der modifizierten Anreicherungsbouillon nach González et al. (2000) in einem Stomacherbeutel gemischt. Die Proben wurden zusammen mit der Anreicherungsbouillon in Reagenzgefäße abgefüllt und mit Alufolie verschlossen. Die Bebrütung fand unter mikroaeroben Bedingungen für zuerst 16 h und danach aerob für 24 h bei 30 °C statt.

#### 3.2.3.2 DNA-Probenaufreinigung und DNA-Extraktion

Nach der Probenvorbereitung und der selektiven Anreicherung nach González et al. (2000) wurde die Reinigung der Proben und Extraktion von *Arcobacter* spezifischen Nukleinsäuren durchgeführt. Dabei wurde die Aufarbeitung nach PrepMan™ (AB, 2002) durchgeführt (Abschnitt C, Kapitel 3.2.2).

#### 3.2.3.3 PCR-Amplifikation

Die benötigten Primer (Hermann Synthetische Biomoleküle, Denzlingen, Deutschland) wurden aus spezifischen 16S rRNA-Sequenzen hergestellt, so dass eine möglichst große *Arcobacter* Spezifität entstanden war (González et al. 2000). Die Primer sind in der Tabelle 10 aufgelistet und verstärken ein 181 bp DNA Fragment.

Tabelle 10: Primer für PCR nach González et al. (2000)

Spezies	Primer	Primer Sequenzen	PCR Produkt
<i>Arcobacter</i> spp.	ARC1	5'-AGAACGGGTTATAGCTTGCTAT-3'	181 bp
	ARC2	5'-GATACAATACAGGCTAATCTCT-3'	

Das für die vorliegende Studie hergestellte PCR Reaktionsgemisch bestand aus 5,0 µl PCR Puffer, aus 5,0 µl dNTP Mix, jeweils 0,5 µl Primer ARC 1 und ARC 2, 0,2 µl Hot

StarTaq Polymerase, 33,8 µl H<sub>2</sub>O und 5,0 µl der Probe (Tab. 11). So entstand für jeden Versuchsansatz 50 µl Reaktionsgemisch, welches in PCR Reaktionsröhrchen aufgeteilt wurde. Zur Überprüfung der Reaktion wurden immer eine Positivkontrolle (*A. butzleri*) und eine no-template-Kontrolle (*Aqua destillata*) durchgeführt. Sofort wurde der Versuchsansatz gekühlt und in den Thermocycler (Applied Biosystems) eingesetzt. Der Thermocycler ist ein Gerät, das für den Ablauf der Polymerasekettenreaktion benötigt wird. Ein typischer PCR Zyklus besteht aus einem Denaturierungsschritt, gefolgt von der Primerhybridisierung und einem Syntheseschritt. Der Thermocycler ermöglicht eine vollautomatische Durchführung verschiedener temperaturabhängiger Reaktionen. Der Thermocycler wurde programmiert für 50 µl Reaktionsvolumen und startete mit einem Heizzyklus für drei min bei 94 °C, dann starteten 25 sich wiederholende Zyklen. Die erste Phase (Denaturierung) wurde eingestellt auf 60 s bei 94 °C, die zweite (Hybridisierung) auf 60 s bei 59 °C und die dritte Phase (Polymerisation) wurde auf 60 s bei 72 °C eingestellt. Ein finaler Elongationsschritt für 7 min bei 72 °C beendete die DNA Amplifikation. Nach dem Ende der PCR Zyklen wurden die Proben wieder bei 4 °C gekühlt.

Tabelle 11: Reaktionsmix für PCR nach González et al. (2000)

Substanz	Konzentration	Volumen je Ansatz in µl	Endkonzentration
PCR Puffer	10 x	5,0	1 x
dNTP-Mix	2,0 mM	5,0	0,2 mM
Primer ARC 1	100,0 µM	0,5	1,0 µM
Primer ARC 2	100,0 µM	0,5	1,0 µM
Hot StarTaq Polymerase	5 U/µl	0,2	1 U
H <sub>2</sub> O		33,8	
Probe (Template)		5,0	
Gesamt		50,0	

### 3.2.3.4 Gelelektrophorese und Dokumentation

Anschließend wurde eine Gelelektrophorese (1,4 % Agarosegel = 2,1 g Agarose in 150 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer und Zugabe von 12 µl Ethidiumbromidlösung mit Konzentration 1mg/ml) im Tris-Acetat-EDTA-Pufferbad bei 95 Volt für 60 min durchgeführt (González et al., 1999). Jede Geltasche wurde zuvor mit 2 µl Ladepuffer und mit 8 µl der jeweiligen Probe gefüllt. Mithilfe eines UV-Transilluminators, einer Kamera und des geeigneten PC-Programms, wurden die Ergebnisse analysiert und dokumentiert.

Bei positiven Proben wurde anschließend aus der modifizierten Anreicherungsbouillon nach González et al. (2000) zur Bestätigung eine m-PCR nach Houf et al. (2000) angeschlossen (Abschnitt C, Kapitel 3.2.4).

### 3.2.4 Genotypische Identifizierung

Die m-PCR wurde zur Bestätigung von verdächtigen Kolonien der modifizierten kulturellen Nachweisverfahren und von *Arcobacter* positiven Proben der modifizierten PCR nach González et al. (2000) durchgeführt. Dafür wurde aus der Literatur das m-PCR Verfahren nach Houf et al. (2000) ausgewählt. Verdächtige Kolonien der Selektivnährmedien wurden dafür als Reinkulturen auf TSA nach 48 h mikroaerober Bebrütung bei 30 °C verwendet. Die Probenaufarbeitung und Nukleinsäureextraktion erfolgte mit der Aufarbeitungsmethode nach PrepMan™ (AB, 2002). Die PCR Amplifikation wurde mit speziell entwickelten Primern (Hermann Synthetische Biomoleküle) durchgeführt. Für das Verfahren nach Houf et al. (2000) sind fünf PCR Primer, ARCO, BUTZ, SKIR, CRY1 und CRY2, basierend auf den 16S rRNA- und 23S rRNA-Sequenzen notwendig. Die selektiven Primer amplifizieren ein 257 bp Fragment von *A. cryaerophilus*, ein 401 bp Fragment von *A. butzleri* und ein 641 bp Fragment von *A. skirrowii*. Diese Primer-Sequenzen sind in der internationalen GenBank veröffentlicht und wurden mithilfe der GeneCompar 2.1-Software entwickelt (Applied Maths). (Tab. 12).



Tabelle 12: Primer für m-PCR nach Houf et al. (2000)

Spezies	Primer	Primer Sequenzen	PCR Produkt
<i>A. butzleri</i>	BUTZ	5'-CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3'	401 bp
	ARCO	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'	
<i>A. skirrowii</i>	SKIR	5'-GGCGATTTACTGGAACACA-3'	641 bp
	ARCO	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'	
<i>A. cryaerophilus</i>	CRY1	5'-TGCTGGAGCGGATAGAAGTA-3'	257 bp
	CRY2	5'-AACAACTACGTCCTTCGAC-3'	

Das für die m-PCR nach Houf et al. (2000) wurde ein PCR Reaktionsgemisch aus 5,0 µl PCR Puffer, 5,0 µl dNTP-Mix, jeweils 0,5 µl der Primer BUTZ, ARCO, CRY 1, CRY 2, 0,25 µl des Primers SKIR, 0,2 µl der Hot StarTaq Polymerase, 32,25 µl H<sub>2</sub>O und 5,0 µl der Probe hergestellt (Tab. 13). So entstand je Probe ein Gesamtvolumen von 50 µl. Sofort wurde der Versuchsansatz gekühlt und in den Thermocycler eingesetzt. Der Thermocycler wurde programmiert und startete mit einem Heizzyklus für 2 min bei 94 °C, dann starteten 32 sich wiederholende Zyklen. Die erste Phase (Denaturierung) wurde eingestellt auf 45 s bei 94 °C, die zweite (Anlagerung) auf 45 s bei 61 °C und die dritte Phase (DNA-Verlängerung) wurde auf 30 s bei 72 °C eingestellt. Ein finaler Elongationsschritt für 7 min bei 72 °C beendete die Zyklen. Nach der Bearbeitung im Thermocycler wurden die Proben wieder bei 4 °C gekühlt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese mit 2 µl Ladepuffer und 8 µl der aufgearbeiteten Bakterienlösung (1.5 % Agarosegel, Zugabe von 12 µl Ethidiumbromidlösung) im Tris-Acetat-EDTA-Pufferbad bei 100 Volt für 40 min durchgeführt. Mithilfe eines UV-Transilluminators, einer Kamera und des geeigneten PC-Programms, wurden die Ergebnisse analysiert und dokumentiert.

Tabelle 13: Reaktionsmix für m-PCR nach Houf et al. (2000)

Substanz	Konzentration	Volumen je Ansatz in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
PCR Puffer	10 x	5,00	1 x
dNTP-Mix	2,0 mM	5,00	0,2 mM
Primer BUTZ	100,0 $\mu\text{M}$	0,50	1,0 $\mu\text{M}$
Primer ARCO	100,0 $\mu\text{M}$	0,50	1,0 $\mu\text{M}$
Primer SKIR	100,0 $\mu\text{M}$	0,25	0,5 $\mu\text{M}$
Primer ARCO	100,0 $\mu\text{M}$	0,50	1,0 $\mu\text{M}$
Primer CRY 1	100,0 $\mu\text{M}$	0,50	1,0 $\mu\text{M}$
Primer CRY 2	100,0 $\mu\text{M}$	0,50	1,0 $\mu\text{M}$
Hot StarTaq Polymerase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,20	1 U
H <sub>2</sub> O		32,25	
Probe (Template)		5,00	
Gesamt		50,00	

Alle verdächtigen Kolonien wurden auf den Subkulturplatten markiert und Material für die Durchführung einer m-PCR nach Houf et al. (2000) entnommen. Das Koloniematerial wurde mit einer Impföse in ein Eppendorfgefäß mit 1 ml *Aqua destillata* überführt und die Arbeitsschritte der m-PCR nach Houf et al. (2000) durchgeführt. Bei Proben, die durch die PCR nach González et al. (2000) als positiv erfasst wurden, wurde ebenfalls die m-PCR nach Houf et al. (2000) durchgeführt. Dafür wurde aus der Bouillon der positiven Probe 1 ml mit einer Pipette entnommen und nach Überführung in ein Eppendorfgefäß aufgearbeitet. Dann wurde die m-PCR nach Houf et al. (2000) durchgeführt.

## Ergebnisse

### 4 Vergleich der verschiedenen Modifikationen von Anzuchtmedien

#### 4.1 Ergebnisse flüssige Nährmedien

Alle *Arcobacter* spp. waren gegenüber Konzentrationen von Cefoperazon bei 16 mg/l, von Piperacillin bei 32 mg/l, von Amphotericin B bei 20 mg/l und von 5-Fluorouracil bei 100 - 150 mg/l tolerant. Die Kombination von 40 mg/l Novobiocin und 100 mg/l Fluorouracil zusätzlich zum CAT Supplement bei der Methode nach González et al. (2000) stellte sich nicht als hemmend für das Wachstum von *Arcobacter* spp. heraus. Bei der Verwendung von höheren Konzentrationen an antimikrobiellen Zusätzen gingen die Wachstumsraten stark zurück. Eine Kombination von mikroaerob und aerober Bebrütung in zeitlicher Abfolge zeigte keine Nachteile beim Wachstum der *Arcobacter* spp. Eine Temperatur von 30 °C lieferte gute Wachstumsbedingungen für *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Um von allen drei *Arcobacter* spp. in der Bouillon mindestens  $1,0 \times 10^8$  KbE/g zu erreichen, war eine Zeit von 48 h ausreichend. Nach den modifizierten Methoden nach Houf et al. (2001), nach Johnson und Murano (1999) und nach González et al. (2000) konnte nach 16 h kein Wachstum von *A. skirrowii* gefunden werden. Details der Untersuchung sind in den Tabellen 20 - 24 im Anhang H zu finden. Anhand dieser Daten wurden die entsprechenden Methoden modifiziert und Rezepte für die Nährmedienherstellung entworfen (Tab. 14).

Tabelle 14: Modifikationen der Anreicherungsbouillons und Bebrütungsbedingungen

Bouillon	Methode	Hemmstoffe	Konzentration <sup>a</sup>	Atmosphäre	Temperatur	Zeit
ASB	de Boer et al. 1996	Piperacillin Cefoperazon	<b>32,0 mg/l</b> <b>16,0 mg/l</b>	<b>Mikroaerob</b>	<b>30 °C</b>	<b>48 h</b>
AJMB	Johnson-Murano 1999	Cefoperazon 5-Fluorouracil	<b>16,0 mg/l</b> <b>150,0 mg/l</b>	Mikroaerob	30 °C	48 h
ABCAT	González et al. 2000	5-Fluorouracil Novobiocin	<b>100,0 mg/l</b> <b>40,0 mg/l</b>	<b>Mikroaerob + aerob</b>	30 °C	16 h + <b>24- 48 h</b>
AHB	Houf et al. 2001	Amphotericin B 5-Fluorouracil	<b>20,0 mg/l</b> <b>150,0 mg/l</b>	Mikroaerob	<b>30 °C</b>	<b>48 h</b>

<sup>a</sup> Modifikationen sind fett gedruckt  
 ASB = *Arcobacter* selective broth  
 AJMB = *Arcobacter* Johnson-Murano broth

ABCAT = *Arcobacter* broth + CAT Supplement  
 AHB = *Arcobacter* Houf broth

## 4.2 Ergebnisse feste Nährmedien

Ein Cefoperazongehalt von 16 mg/l und ein Piperacillingehalt von 32 mg/l stellten sich als maximale Konzentrationen heraus, bei denen die *Arcobacter* spp. nicht in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Ebenso stellten sich ein 5-Fluorouracilgehalt von 100 - 150 mg/l und ein Amphotericingehalt von 20 mg/l als nicht das Wachstum hemmend heraus. Bei einem Salzgehalt (NaCl) von nur 0,8 mg/l waren die Nachweiszahlen größer als bei einem Salzgehalt (NaCl) von 1,5 mg/l. Eine zusätzliche aerobe Bebrütung hatte sehr geringe Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Kolonien. Die Nachweiszahlen gingen nur leicht zurück. Eine Temperatur von 30 °C unterstützte die mesophilen Temperaturbedürfnisse der Erreger. Für eine Wachstumsrate von mindestens  $1,0 \times 10^8$  KbE/g war eine Bebrütung von 48 h notwendig. Details der Untersuchung sind in den Tabellen 25 - 28 im Anhang H zu finden. Anhand dieser Daten wurden die entsprechenden Methoden modifiziert und Rezepte für die Nährmedienherstellung entworfen (Tab. 15).

Tabelle 15: Modifikationen der selektiven Nährböden und Bebrütungsbedingungen

Nährboden	Methode	Hemmstoffe	Konzentration <sup>a</sup>	Atmosphäre	Temperatur	Zeit
ASM	De Boer et al. 1996	Piperacillin Cefoperazon	<b>32,0</b> mg/l <b>16,0</b> mg/l	<b>Mikroaerob</b>	30 °C	<b>24 - 48 h</b>
AJMM	Johnson und Murano 1999	Cefoperazon	<b>16,0</b> mg/l	<b>Mikroaerob</b>	30 °C	<b>24 - 48 h</b>
mCIN/CAT	González et al. 2000	5-Fluorouracil NaCL	<b>100,0</b> mg/l <b>0,8</b> g/l	<b>Mikroaerob</b> + aerob	30 °C	<b>16 h + 24 h</b>
AHM	Houf et al. 2001	Amphotericin B 5-Fluorouracil	<b>20,0</b> mg/l <b>150,0</b> mg/l	Mikroaerob	30 °C	<b>24 - 48 h</b>

<sup>a</sup> Modifikationen sind fett gedruckt

ASM = *Arcobacter* selective medium

AJMM = *Arcobacter* Johnson-Murano medium

mCIN/CAT = Modified cefsulodin-iragasan-novobiocin (mCIN) agar mit CAT

AHM = *Arcobacter* Houf medium

## 5 Vergleich der Modifikationen der PCR

Bei einer Koloniezahl von  $10^4$  KbE/g waren mit der Aufarbeitung nach PrepMan™ ähnliche Ergebnisse als mit der Aufarbeitung nach González et al. (2000) zu sehen. Bei einer Koloniezahl von  $10^2$  KbE/g zeigte sich durch die PCR Bestätigung bei der Methode nach PrepMan™ nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht eindeutigere und klarer ersichtliche

Banden. Besonders bei *A. skirrowii* waren nach der PrepMan™-Aufarbeitung (AB, 2002) die Banden klarer zu erkennen. Einzelheiten der Untersuchung sind in den Tabellen 29 und 30 im Anhang zu finden.

Die Durchführung der DNA-Reinigung nach PrepMan™ dauerte zirka 25 min. Die DNA-Reinigung nach González et al. (2000) konnte in zirka 130 min durchgeführt werden. Die Aufarbeitung nach PrepMan™ benötigt deutlich weniger Zeit und weniger Material.

## 6 Vergleich der kulturellen Untersuchungsverfahren zum Erregernachweis

Von 146 untersuchten nicht verzehrfertigen Geflügelfleischprodukten konnten mit der modifizierten Methode nach de Boer et al. (1996) in 47 Proben *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Mit der modifizierten Methode nach Johnson und Murano (1999) konnten in 60 Proben *Arcobacter* spp. gefunden werden. Mit der modifizierten Methode nach González et al. (2000) waren von 146 Proben 65 Proben und mit der modifizierten Methode nach Houf et al. (2001) 54 Proben positiv. (Tab. 16).

Tabelle 16: Kultureller Nachweis von *Arcobacter*

Modifizierte Methode	Nicht verzehrfertige Erzeugnisse				
	Huhn (112) <sup>a</sup>	Pute (14)	Gans (9)	Ente (11)	Gesamt (146)
De Boer et al. 1996	35 (31 %)	7 (50 %)	1 (11 %)	4 (36 %)	47 (32 %)
Johnson und Murano 1999	48 (43 %)	7 (50 %)	1 (11 %)	4 (36 %)	60 (41 %)
González et al. 2000	53 (47 %)	7 (50 %)	1 (11 %)	4 (36 %)	65 (45 %)
Houf et al. 2001	42 (38 %)	7 (50 %)	1 (11 %)	4 (36 %)	54 (37 %)

<sup>a</sup> Anzahl Proben

Im Einzelnen waren mit der modifizierten Methode nach de Boer et al. (1996) 44mal *A. butzleri* und in nur 3 Fällen *A. cryaerophilus* zu finden. Mithilfe der modifizierten Methode nach de Boer et al. (1996) konnte in keiner der Proben *A. skirrowii* isoliert werden (Tab. 17). Durch die modifizierte Methode nach Houf et al. (2001) wurde aus den rohen Geflügelproben 46mal *A. butzleri*, sechsmal *A. cryaerophilus* und zweimal *A. skirrowii* isoliert. Die Nachweiszahlen erhöhten sich nochmals durch die modifizierte Methode nach Johnson und Murano (1999). Hier waren *A. butzleri* 50mal, *A. cryaerophilus* sechsmal und

*A. skirrowii* viermal in den Proben zu finden. Das beste Nachweisergebnis zeigte sich durch die modifizierte Methode nach González et al. (2000). Die Nachweiszahlen für *A. butzleri* erhöhten sich auf 54 für *A. cryaerophilus* auf 7 und für *A. skirrowii* auf 4 positive Proben.

Tabelle 17: Bestätigung verdächtiger kultureller Proben aus nicht verzehrfertigen Geflügelprodukten mit m-PCR nach Houf et al. (2000)

Genus	Methode	Anzahl der positiven Proben (%)				
		Huhn (112) <sup>a</sup>	Pute (14)	Gans (9)	Ente (11)	Gesamt (146)
<i>A. butzleri</i>	Mod. <sup>b</sup> Methode de Boer et al. 1996	33	6	1	4	44 (30)
	Mod. Methode Johnson Murano 1999	39	6	1	4	50 (34)
	Mod. Methode González et al. 2000	43	6	1	4	54 (37)
	Mod. Methode Houf et al. 2001	35	6	1	4	46 (32)
<i>A. cryaerophilus</i>	Mod. Methode de Boer et al. 1996	2	1	0	0	3 (2)
	Mod. Methode Johnson Murano 1999	5	1	0	0	6 (4)
	Mod. Methode González et al. 2000	6	1	0	0	7 (4)
	Mod. Methode Houf et al. 2001	5	1	0	0	6 (4)
<i>A. skirrowii</i>	Mod. Methode de Boer et al. 1996	0	0	0	0	0 (0)
	Mod. Methode Johnson Murano 1999	4	0	0	0	4 (3)
	Mod. Methode González et al. 2000	4	0	0	0	4 (3)
	Mod. Methode Houf et al. 2001	2	0	0	0	2 (1)

<sup>a</sup> Anzahl Proben

<sup>b</sup>Mod.= Modifizierte

## 7 Nachweis von *Arcobacter* spp. in der Gesamtheit der untersuchten Proben mit modifizierter PCR nach González et al. (2000)

Mit der in dieser Versuchsanordnung verwendeten kombinierten Nachweismethode, dem modifizierten Anreicherungsverfahren nach González et al. (2000), der Probenaufarbeitung nach PrepMan™ und der PCR nach González et al. (2000), konnten bei 79 (54 %) von 146 der untersuchten rohen Geflügelfleischproben *Arcobacter* nachgewiesen werden

(Tab. 18). Es wurden 112 rohe Hähnchenfleischprodukte untersucht und in 59 % dieser Proben waren *Arcobacter* nachweisbar. *Arcobacter* waren sowohl in Produkten direkt vom Erzeuger, als auch in Proben vom Wochenmarkt, aus dem Groß- oder Einzelhandel nachweisbar. Es konnten keine deutlichen Unterschiede bei der Länderherkunft der Produkte gefunden werden. Von 14 untersuchten Putenfleischprodukten waren in 7 Fällen *Arcobacter* nachweisbar. Des Weiteren wurden bei 11 untersuchten Entenfleischprodukten in 5 Fällen *Arcobacter* nachgewiesen und von insgesamt neun untersuchten Gänsefleischprodukten war eine Probe positiv (Tab. 18).

Tabelle 18: Nachweis von *Arcobacter* in den untersuchten Proben mittels PCR

<b>Nicht verzehrfertige Erzeugnisse</b>				
<b>Huhn (112)<sup>a</sup></b>	<b>Pute (14)</b>	<b>Gans (9)</b>	<b>Ente (11)</b>	<b>Gesamt (146)</b>
66 (59 %)	7 (50 %)	1 (11 %)	5 (46 %)	79 (54 %)

Es konnte nur in rohen, nicht aber in verzehrfertigen Geflügelfleischerzeugnissen *Arcobacter* Spezies nachgewiesen werden. Bei 63 hitzebehandelten Erzeugnissen konnten weder kulturell, noch mit PCR *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Untersucht wurden ausschließlich von Geflügel stammende Erzeugnisse. Alle diese Produkte waren auch ohne weitere Erhitzung oder Verarbeitung direkt für den menschlichen Verzehr vorgesehen.

## 8 Bestätigung von *Arcobacter* spp. in den Erzeugnisgruppen mit PCR nach Houf et al. (2000)

Alle drei *Arcobacter* spp. konnten in Proben von Huhn gefunden werden (Tab. 19). *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* konnten in einer Putenprobe nachgewiesen werden. In den Proben von Gans und Ente konnte nur *A. butzleri* nachgewiesen werden.

Es wurde eine Probe rohes Geflügelhacksteak untersucht. Bei dieser Probe handelte es sich um ein frisches, unbehandeltes Lebensmittel aus dem Einzelhandel in Deutschland. In dieser Probe waren *A. butzleri* nachweisbar.

Tabelle 19: Nachweis von *Arcobacter* spp. in den Geflügelproben mittels PCR

Spezies	Nicht verzehrfertige Erzeugnisse				
	Huhn(112) <sup>a</sup>	Pute(14)	Gans (9)	Ente (11)	Gesamt (146)
<i>A. butzleri</i>	58 (52 %)	6 (43 %)	1 (11 %)	5 (46 %)	70 (48 %)
<i>A. cryaerophilus</i>	11 (10 %)	1 (7 %)	0	0	12 (8 %)
<i>A. skirrowii</i>	6 (5 %)	0	0	0	6 (4 %)

<sup>a</sup> Anzahl Proben

## 9 Gegenüberstellung der PCR-Methodik mit den modifizierten kulturellen Nachweisverfahren

Von den 146 nicht verzehrfertigen Geflügelfleischprodukten konnten mit der modifizierten PCR nach González et al. (2000) in 79 Proben spezifische Sequenzen detektiert werden. Das entspricht einem Anteil von 54 % aller Rohprodukte. Auch mit dieser PCR Methode konnte in keiner der wärmebehandelten Proben *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Durch die modifizierten Methoden nach de Boer et al. (1996) waren 47 Proben (32 %), nach Houf et al. (2001) 54 Proben (37 %), nach Johnson und Murano (1999) 60 Proben (41 %) und nach González et al. (2000) 65 Proben (45 %) des auf *Arcobacter* spp. untersuchten Geflügelfleisches positiv getestet (Abb. 8).



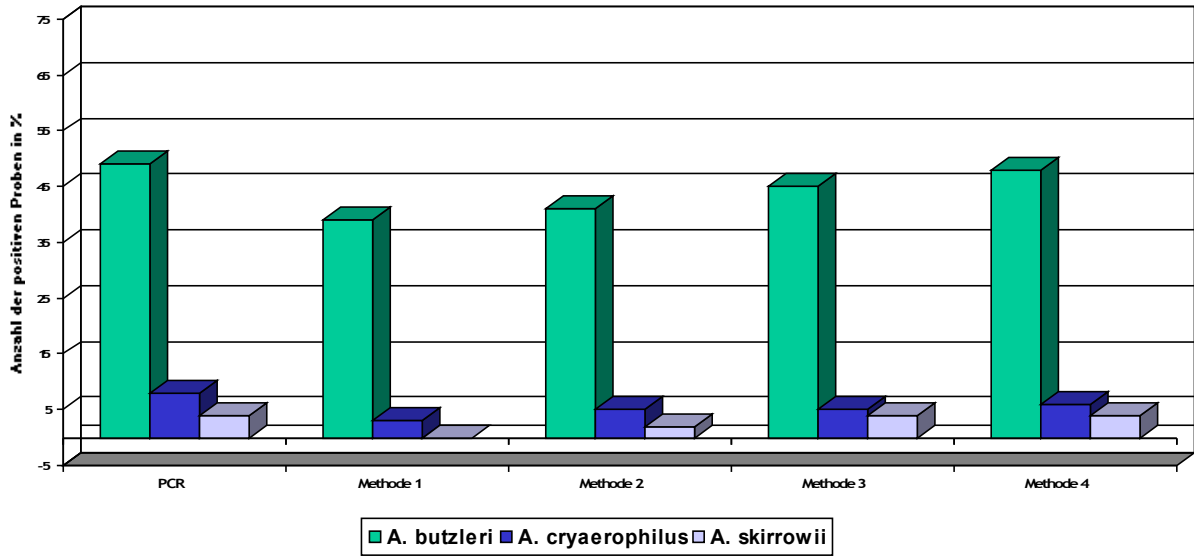


Abbildung 2: Gegenüberstellung der Nachweismethoden von *Arcobacter*

Methode 1= Modifizierte Methode nach de Boer et al. (1996)

Methode 2= Modifizierte Methode nach Houf et al. (2001)

Methode 3= Modifizierte Methode nach Johnson und Murano (1999)

Methode 4= Modifizierte Methode nach González et al. (2000)

## C Diskussion

Nach derzeitigen Erkenntnissen lassen die Nachweiszahlen von *Arcobacter* in Fleisch auf eine weite Verbreitung des Erregers schließen. Leider existiert keine Standardmethode für den Nachweis von *Arcobacter* in Lebensmitteln. In vorliegender Studie sollte eine Nachweismethode etabliert, und mit dieser Methode Ergebnisse über das Vorkommen von *Arcobacter* in Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnissen überprüft werden.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden zunächst sowohl die für diese Arbeit günstigsten kulturellen, als auch molekularbiologischen Methoden ausgewählt. Um viele Daten über *Arcobacter* zu gewinnen, wurde eine PCR Methode nach González et al. (2000), eine m-PCR Methode nach Houf et al. (2000) und vier kulturelle Nachweisverfahren nach de Boer et al. (1996), Johnson und Murano (1999), González et al. (2000) und Houf et al. (2001) ausgewählt. Zuerst wurden die vier kulturellen Methoden, die Anreicherung und die DNA Reinigung der PCR nach González et al. (2000) für den Nachweis optimiert.

Für Modifikationen der verwendeten Nährmedien wurden Stammkulturen von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei *Arcobacter* spp. in den Anreicherungsbouillons gegenüber Konzentrationen von Cefoperazon bei 16 mg/l, von Piperacillin bei 32 mg/l, von Amphotericin B bei 20 mg/l und von 5-Fluorouracil bei 100 - 150 mg/l tolerant sind. Bei höheren Konzentrationen der Zusätze ging das Wachstum aller drei *Arcobacter* spp. zurück. Besonders verzögerte sich das Wachstum von *A. skirrowii*. Aus diesen Ergebnissen können die gleichen Schlussfolgerungen wie bei Houf et al. (2001A) gezogen werden. Eine Verwendung von Piperacillin in einer Konzentration von 64 mg/l wirkt sich nachteilig auf das Wachstum von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* aus. Auch bei einer Erhöhung der Konzentration von Cefoperazon wachsen *Arcobacter* schlechter (Bolton et al. 1988; Johnson and Murano 1999). Die Kombination von 40 mg/L Novobiocin und 100 mg/l Fluorouracil, zusätzlich zum CAT-Supplement bei der Methode nach González et al. (2000), stellte sich als maximal verträglich heraus. Höhere Konzentrationen der Zusätze schwächten die Bakterien, und die Wachstumsraten gingen stark zurück.

Bei den Ergebnissen der festen Nährmedien stellten sich ein Cefoperazongehalt von 16 mg/l und ein Piperacillingehalt von 32 mg/l als maximal verträgliche Konzentrationen der antimikrobiellen Substanzen heraus, bei denen die *Arcobacter* spp. in ihrem Wachstum wenig gehemmt werden. Ebenso stellten sich ein 5-Fluorouracilgehalt von 100 - 150 mg/l

und ein Amphotericingehalt von 20 mg/l als gut verträglich heraus. Die optimal ermittelten Konzentrationen der festen Nährmedien bestätigten die ermittelten Konzentrationen der flüssigen Nährmedien. Ein Salzgehalt (NaCl) von nur 0,8 mg/l wurde von den Kulturen besser vertragen als höhere Gehalte. Der ursprüngliche höhere Salzgehalt nach der Methode von González et al. (2000) hemmt das Wachstum aller drei *Arcobacter* spp. Somit zeigte eine Erniedrigung des Salzgehalts (NaCl) höhere Nachweisraten bei der Kultivierung.

Eine Kombination von mikroaerobem und aerobem Bebrütungs zeigte keine Nachteile beim Wachstum der *Arcobacter*. Es konnte bei allen drei *Arcobacter* spp. ähnlich hohe Nachweisraten erzielt werden. Diese Ergebnisse konnten sich im Vergleich der verschiedenen Anreicherungsbedingungen mit Überprüfung mittels PCR wieder bestätigen. Vorteil der mikroaeroben und anschließenden aeroben Bebrütung ist ein vermindertes Wachstum der Begleitflora. Da besonders *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* langsamer wachsen, zeigte sich bei der Untersuchung der Proben aus dem Einzelhandel, dass für das Erkennen von typischen Kolonien die Unterdrückung der Begleitflora von großer Bedeutung ist. Wie bei den Vergleichsmethoden nach Scullion et al. (2004) waren nach einer Bebrütungsdauer der Anreicherungen von mindestens 40 h höhere Nachweiszahlen als nach 24 h zu verzeichnen. Eine Anreicherungsdauer von 40 h wird als notwendig gesehen, um zu guten Wachstumsergebnissen von *Arcobacter* spp. auf den selektiven Agars zu führen.

Die modifizierte kulturelle Methode nach González et al. (2000) zeigte die höchsten Nachweiszahlen und ist für eine Kombination mit der PCR Methode nach González et al. (2000) geeignet. Zuerst wurden Arbeitsabläufe für die Durchführung der PCR verbessert. Dafür wurde die ursprüngliche DNA-Aufarbeitung getestet. Die Ergebnisse der Aufarbeitung nach González et al. (2000) zeigen im Vergleich zur einfacheren Aufarbeitung nach PrepMan™, dass die Stämme in viel geringeren Zahlen nach der Durchführung nachgewiesen wurden. Die aufwändige Aufarbeitung nach González et al. (2000) eignet sich nach diesen Versuchsergebnissen nicht zur Aufreinigung von *Arcobacter* spp. in Geflügelproben, da die Nachweiszahlen geringer sind und die Aufarbeitung 2 h dauert. Die Aufarbeitung nach PrepMan™ ist einfacher und schneller durchzuführen und die Nachweiszahlen liegen über denen der Aufarbeitung nach González et al. (2000).

Durch die modifizierten Methoden nach Houf et al. (2001), Johnson und Murano (1999) und González et al. (2000) konnten alle drei gesuchten *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Kolonien von *Arcobacter* sind auf den selektiven Agarplatten halbdurchscheinend,

---

glänzend, rund, beige bis gelblich. Besonders die Kolonien von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* sind nach 48 h Bebrütung bei 37 °C kleiner als 1,5 mm. Die Kolonien von *A. butzleri* sind nach dieser Zeit in der Regel größer als 2 mm. Aufgrund der Beschaffenheit der Agarplatten ist auf den Nährböden nach Houf et al. (2001) und de Boer et al. (1996) die Erkennung der verdächtigen Kolonien schwieriger als auf den Agarplatten nach Johnson und Murano (1999) und González et al. (2000). Aufgrund der beschriebenen unterschiedlichen Koloniemorphologien von *Arcobacter* auf den Selektivplatten und in Verbindung mit dem Wachstum anderer Mikroorganismen während der Probenuntersuchungen, war das Auffinden der verdächtigen Kolonien, insbesondere bei stark bewachsenen Agarplatten, erschwert. Besonders auf den farblosen Nährböden war für die Erkennung von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* mindestens 48 h Bebrütungszeit notwendig und nach 48 h Bebrütungszeit zum Teil ein sehr starkes Wachstum von Fremdkeimen zu verzeichnen.

Die *Arcobacter* Kolonien wachsen bei aerober Bebrütung viel langsamer als bei mikroaerober Bebrütung. So zeigten sich bei der modifizierten Methode nach Johnson und Murano (1999), bei der die Anreicherung und die Nährböden nur aerob bebrütet wurden, niedrigere Nachweiszahlen als bei der modifizierten Methode nach González et al. (2000). Weitere Probleme entstanden bei der Handhabung des Nährmediums nach Johnson und Murano (1999). Durch die weichere Konsistenz des Nährbodens war das Beimpfen des Nährbodens nach dem Dreiösenausstrichprinzip schwieriger und es zeigte sich auch, dass die Agarplatten nur 2 Wochen verwendbar waren. Probleme mit der Haltbarkeit und in der Vermeidung von Kontaminationen sind anscheinend auf die Beschaffenheit des Nährbodens zurückzuführen. Die zum Nachweis von *Arcobacter* benötigten Anreicherungsbouillons und Nährböden lassen sich in der eigenen Nährbodenküche selbst herstellen. Im Handel sind keine geeigneten Fertignährmedien erhältlich, die ohne weitere Bearbeitung eingesetzt werden können. Die Selektivität der selbst hergestellten Nährmedien kann erheblich schwanken und es sollte immer eine Qualitätskontrolle stattfinden.

Im Vergleich der kulturellen Verfahren zum Erregernachweis erwies sich die modifizierte Methode nach de Boer et al. (1996) als schlechteste Methode. *A. skirrowii* konnte mit dieser Methode nicht gefunden werden. Auch die Reduzierung der Konzentration an Cefoperazon und Piperacillin im Nährmedium konnte die Nachweiszahlen für *A. skirrowii* in naturkontaminierten Proben nicht verbessern. In Tests mit Reinkulturen von *A. skirrowii* lagen die Nachweiszahlen höher.

Im Vergleich zu den zwei besten modifizierten kulturellen Nachweismethoden, nämlich nach Johnson und Murano (1999), mit einem Nachweis in 60 von 146 rohen Geflügelfleisch, und nach González et al. (2000), mit einem Nachweis in 65 von 146 Geflügelfleischproben, konnten durch die Verwendung einer PCR Methode nach González et al. (2000) in insgesamt 79 (54 %) Proben *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Mit der modifizierten PCR Methode nach González et al. (2000) wurden mehr positive Proben gefunden, als mit den modifizierten kulturellen Nachweisverfahren. Alle 79 Proben, die durch die modifizierte PCR Methode nach González et al. (2000) als positiv erkannt wurden, konnten durch das Identifizierungsverfahren nach Houf et al. (2000) bestätigt werden. Die Resultate dieser Studie zeigen, dass eine PCR Methode gegenüber der kulturellen Nachweismethode überlegen ist. González et al. (2000) fanden bei ihren Untersuchungen aus 96 im Einzelhandel gekauften Hühnchenfleischproben zu 53 % *Arcobacter* spp. Diese Zahlen stimmen mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen überein.

Im Falle von *Arcobacter* kann die DNA-Methode schnell zum Nachweis dieser langsam wachsenden und schwer kultivierbaren Bakterien eingesetzt werden. Sie liefert viel schneller ein Ergebnis als die herkömmlichen kulturellen Methoden. Die PCR Methode nach González et al. (2000) ist schnell und einfach durchzuführen und zeigt hohe Nachweiszahlen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die PCR Methode sich für den Nachweis von *Arcobacter* in Geflügelfleischproben als die überlegene Methode herausgestellt hat. Die PCR Methode nach González et al. (2000) dient als geeignete Alternative zur kulturellen Anzucht. Für den Routineeinsatz im Labor stellt die PCR ein schnelles und sensitives Screeningverfahren dar. Auch die Kosten und der personelle Aufwand sind hier im Vergleich zum kulturellen Verfahren etwas geringer. Aber das Screeningverfahren alleine reicht nicht für die Beurteilung des Lebensmittels. Für die lebensmittelrechtliche Beurteilung der Lebensmittelproben muss sich danach eine kulturelle Isolierung des Keimes anschließen. Nach den vorliegenden Ergebnissen eignet sich hierfür am besten das modifizierte kulturelle Nachweisverfahren nach González et al. (2000). Eine PCR Technik erlaubt ein schnelleres und effizienteres Arbeiten und führt dennoch zu sicheren Ergebnissen.

Im Untersuchungszeitraum von Januar 2006 bis April 2007 wurden insgesamt 209 Proben Geflügelfleisch und Geflügelfleischerzeugnisse untersucht. In diesen Versuchsreihen

---

konnte bei allen vier untersuchten Geflügelarten (Huhn, Pute, Gans und Ente) *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass von 146 untersuchten rohen Proben insgesamt mittels PCR nach González et al. (2000) bei 54 % *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden konnte. Somit konnte bestätigt werden, dass insbesondere rohes Geflügelfleisch in hohen Prozentsätzen mit *Arcobacter* kontaminiert ist. Die höchsten Nachweiszahlen sind bei Hähnchenfleisch mit 59 % zu finden. Atanassova et al. (2008) untersuchten ebenfalls Hähnchenfleisch und fanden in einer Prävalenz von 43 % *Arcobacter* spp.. González et al. (2008) konnten mit PCR bei 29 von 32 Hähnchenproben *Arcobacter* spp. nachweisen. Die Nachweiszahlen bei Putenfleisch mit 50 % und bei Entenfleisch mit 46 % sind nur etwas niedriger als bei Hähnchenfleisch. Dagegen konnten nur in 11 % Gänsefleisch *Arcobacter* nachgewiesen werden. Atabay et al. (2008) untersuchten Kloakenabstriche von Gänsen und fanden zu 18 % positive Proben. Die Resultate machen deutlich, dass Geflügelfleisch eine Infektionsquelle für *Arcobacter* darstellt, aber nicht alle Geflügelarten gleich belastet sind. In der Literatur finden sich große Unterschiede über Nachweiszahlen von *Arcobacter* in Fleisch. Für den Nachweis in Gänsefleisch lassen sich bislang keine Daten miteinander vergleichen. Es konnte mit diesen Untersuchungen nicht geklärt werden, ob die Unterschiede innerhalb der Geflügelarten signifikant vorkommen oder zufällig sind. Eine Ursache für die unterschiedlichen Nachweiszahlen von *Arcobacter* liegt insbesondere in der Verwendung unterschiedlicher Isolierungsverfahren. In Japan fanden Kabeya et al. (2004) in 23 % der Hühnerfleischproben *Arcobacter* spp. In Australien konnte der Erreger in 73 % Hühnerfleischproben nachgewiesen werden (Rivas et al., 2004). In Deutschland fanden Rohder et al. (2007) in 37 % Hühnerfleischproben und Bartholomä und Naumann (2006) in 85 % Hühnerfleischproben *Arcobacter*. In deren Ergebnissen war *A. butzleri* die am häufigsten nachgewiesene Spezies gefolgt von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*.

Die eigene Studie zeigte, dass mit dem PCR Verfahren nach González et al. (2000) *A. butzleri* zu 48 %, *A. cryaerophilus* zu 8 % und *A. skirrowii* zu 4 % in den 146 rohen Proben nachweisbar waren. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen verdeutlichen, dass sich alle drei Erreger, die als eventuelle Lebensmittelinfektionserreger für den Menschen von Bedeutung sind, in Geflügelfleisch nachweisen lassen. Nach der Optimierung der Methoden konnte mit drei kulturellen Nachweisverfahren *A. skirrowii* in natürlich kontaminierten Geflügelfleischproben gefunden werden. Trotz der Senkung der Konzentrationen der antimikrobiellen Substanzen konnte mit der modifizierten kulturellen Methode nach de Boer et al. (1996) in keiner Probe *A. skirrowii* nachgewiesen werden. Houf et al. (2001A) erklärten,

dass möglicherweise der zu hohe Gehalt an Piperacillin dafür verantwortlich war, dass de Boer et al. (1996) nur *A. butzleri* isolieren konnten. In dieser Arbeit konnte nach der modifizierten Methode nach de Boer et al. (1996) *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund für das Misslingen der Isolation von *A. skirrowii* könnte das Überwachsen des Erregers durch konkurrierende Erreger sein. Scullion et al. (2004) verglichen drei Isolationsmethoden und fanden nur mit einer Methode *A. skirrowii*. Son et al. (2007B) untersuchten das Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Hähnchenfleisch und konnten nur *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* Spezies nachweisen.

Außerdem wurden 63 hitzebehandelte Erzeugnisse auf das Vorkommen von *Arcobacter* untersucht. Hier konnte weder kulturell, noch mit PCR *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden. Untersucht wurden ausschließlich vom Geflügel stammende Rohwürste, Brühwürste und Dönerzubereitungen. Dies Ergebnis bestätigte die bisherigen Annahmen von Phillips (2000) und Lehner et al. (2005), die das Vorkommen von *Arcobacter* spp. nur in rohem Fleisch, nicht aber in erhitzten Lebensmitteln beschrieben.

### **Schlussfolgerungen**

Nach der Optimierung waren durch die kulturellen Verfahren nach Johnson und Murano (1999), González et al. (2000) und Houf et al. (2001) *A. skirrowii* nachzuweisen. Unter den Methoden zeigte die modifizierte kulturelle Methode nach González et al. (2000) die höchsten Nachweisraten für *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*.

Die PCR Methode nach González et al. (2000) stellte sich im Vergleich zu den vier kulturellen Methoden als sensitivste und schnellste Nachweismethode für *Arcobacter* heraus.

Es konnte mit den Nachweismethoden gezeigt werden, dass untersuchtes nichtverzehrfertiges Geflügelfleisch in hohen Prozentsätzen mit *Arcobacter* spp. kontaminiert ist. Besonders in Hähnchenfleisch konnte eine hohe Prävalenz nachgewiesen werden. *A. butzleri* war die am häufigsten nachgewiesene Spezies. Mit den Nachweismethoden konnte in keinem der verzehrfertigen Geflügelfleischerzeugnisse *Arcobacter* spp. nachgewiesen werden.

## D Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat das Bakterium *Arcobacter* durch sein Vorkommen in Lebensmitteln eine erhöhte Aufmerksamkeit erreicht. Es existiert jedoch noch keine anerkannte Referenzmethode für den Nachweis von *Arcobacter*. Eine Schwierigkeit besteht darin, dass *Arcobacter* und *Campylobacter* häufig zusammen auftreten und mit kulturellen Verfahren nicht sicher voneinander zu unterscheiden sind. Von Bedeutung für die Unterscheidung zu *Campylobacter* ist, dass *Arcobacter* aerotolerant ist und auch bei viel niedrigeren Temperaturen wächst.

Ziel dieser Untersuchung im Rahmen einer Dissertation war es, zuerst verschiedene kulturelle Nachweisverfahren und ein PCR Verfahren zu optimieren. Im zweiten Schritt sollten die modifizierten Verfahren miteinander verglichen und das Vorkommen von *Arcobacter* in Geflügelfleisch untersucht werden. Es wurden ausschließlich vom Geflügel stammende Lebensmittelproben (n=209) untersucht. Neben Rohwaren (n=146), wie Hähnchen-, Enten-, Gänse- und Putenfleisch, wurden auch verzehrfertige Erzeugnisse wie Roh- und Brühwürste und gegarte Geflügelhackfleischerzeugnisse (n=63) untersucht. Zuerst wurden vier kulturelle Nachweisverfahren aus der Literatur ausgewählt und optimiert. Die kulturellen Verfahren nach de Boer et al. (1996), Houf et al. (2001), Johnson und Murano (1999) und González et al. (2000) wurden untereinander und mit einer PCR Methode nach Gonzales et al. (2000) verglichen. Alle verdächtigen *Arcobacter* Isolate wurden mit einer speziesspezifischen m-PCR nach Houf et al. (2000) untersucht. Dabei konnte bei 79 rohen Geflügelfleischprodukten (54 % aller Rohprodukte) mit der PCR nach González et al. (2000) aus der Anreicherung *Arcobacter* detektiert werden. In den verzehrfertigen Erzeugnissen konnten keine *Arcobacter* nachgewiesen werden. Von den 79 PCR-positiven Proben konnten mit Hilfe der kulturellen Methode nach de Boer et al. (1996) 47 (32 % der positiven rohen Produkte), mit der Methode nach Houf et al. (2001) 54 (37 %), mit der Methode nach Johnson und Murano (1999) 60 (41 %) und mit der Methode nach González et al. (2000) 65 (45 %) erfolgreich nachgewiesen werden. Von den 79 PCR-positiven Proben waren in 70 Proben *A. butzleri*, in 12 Proben *A. cryaerophilus* und in 6 Proben *A. skirrowii* zu identifizieren. Positiv waren von 112 rohen Hähnchenfleischprodukten 66 (59%), von 14 rohen Putenfleischprodukten 7 (50 %), von 11 rohen Entenfleischprodukten 5 (46 %) und von 9 rohen Gänsefleischprodukten eines (11 %).



Mit den Untersuchungen konnten Daten zum Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch erhoben werden. Die höchsten Nachweisraten konnten bei Hähnchenfleisch ermittelt werden. Bei anderem Geflügelfleisch lagen die Nachweisraten niedriger. Als häufigster Erreger konnte *A. butzleri* nachgewiesen werden. Die vier kulturellen Nachweisverfahren zeigten sehr große Unterschiede. Im Vergleich konnte die höchste Sensitivität mit dem Nachweisverfahren nach González et al. (2000) erzielt werden. Die PCR nach González et al. (2000) war den kulturellen Nachweisverfahren hinsichtlich der Sensitivität deutlich überlegen. Zudem können mit der PCR als Screeningmethode negative Proben innerhalb von 48 h identifiziert werden. Auch der Arbeitsaufwand ist geringer. Für den Routineeinsatz im Labor stellt die PCR ein schnelles und sensibles Screeningverfahren dar.

## E Summary

### “Comparison of a PCR and four modified culture methods for detection of *Arcobacter* spp. in poultry and poultry products”

Interest for *Arcobacter* in public health has increased over the last years. Several studies have been conducted to determine the occurrence of *Arcobacter* in different foods. This group of bacteria has frequently been isolated from poultry meat. At present no standard isolation method for *Arcobacter* is available which limits the ability to compare the reported isolations rates. Furthermore, correct identification of *Arcobacter* is difficult. They are easily misidentified as *Campylobacter*, especially when biochemical methods are applied. However, using DNA-based method, a reliable identification can be performed. The aim of this dissertation was to optimise four culture methods for detection of the three most common *Arcobacter* species (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii*) associated with human disease. These four modified methods were compared with each other and with a PCR method using naturally contaminated poultry and poultry products.

Four different isolation methods (de Boer et al., 1996; Houf et al., 2001; Johnson and Murano, 1999; González et al., 2000) were after optimisation compared with each other and with a PCR method (Gonzales et al., 2000). For species identification, a multiplex-PCR method was used (Houf et al., 2000). A total of 209 samples of raw poultry (146) and poultry products (63) were tested with the 4 modified methods and the PCR method. The isolation rates in raw poultry using modified de Boer et al. (1996), Houf et al. (2001), Johnson and Murano (1999) and González et al. (2000) methods were 32% (47/146), 37% (54/146), 41% (60/146) and 45% (65/146), respectively. The most commonly isolated species with all culture methods was *A. buzleri*. In total, 54% (79/146) of the raw poultry samples were positive for *Arcobacter* by PCR: 59% (66/112) of chicken, 50% (7/14) of turkey, 46% (5/11) of duck samples and from 9 goose products only a single sample (11%). *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* were detected in 70 (89%), 12 (15%) and 6 (8%) of 79 PCR-positive raw poultry samples, respectively. All processed poultry products were negative with all methods.

This study shows that there was a clear difference in the sensitivity between the culture methods. The highest isolation rate was obtained by the modified culture method of González et al. (2000) and the lowest one with the modified method of de Boer et al.

(1996). The PCR method was more sensitive than any of the culture methods. PCR is an alternative method for rapid and specific screening of food samples. Raw poultry, especially chicken, was shown to be highly contaminated with *Arcobacter* with all methods and the most common species was *A. buzleri*.

## F Anhang

### 1 Nährmedien und Reagenzien für kulturellen Nachweis: Bouillons

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Bouillon zur Isolierung von *Arcobacter* nach de Boer

**Kurzform:** ASB

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Brucella</i> broth powder	BD	Art. Nr. 211088
------------------------------	----	-----------------

**Supplement(e):**

Lysiertes Pferdeblut	Oxoid	Art. Nr. SR 48
Piperacillin-Lösung	Sigma (s. Rezept PIP)	Art. Nr. P8396
Cefoperazon-Lösung	Sigma (s. Rezept CEFA)	Art. Nr. C4292
Trimethoprim-Lösung	Sigma (s. Rezept TRI)	Art. Nr. T7883
Cycloheximide-Lösung	Sigma (s. Rezept CYCLO)	Art. Nr. C7698

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **28 g** *Brucella* broth powder in **910 ml** dest. Wasser lösen
- autoklavieren: **15 min / 121 °C**
- auf ca. 43 °C abkühlen lassen
- sterile Zugabe der Supplemente:
- 50 ml lysiertes Pferdeblut
- 32 mg Piperacillin-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
- 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
- 20 mg Trimenthoprim-Lösung (in 4 ml 96 % Ethanol + 6 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
- 100 mg Cycloheximide-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
- pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)

- In Röhrchen à **10 ml** abfüllen

**Bezeichnung:** Komponenten für ASB/ASM Medium nach de Boer

**Kurzform:** Komponente 1: PIP

Komponente 2: CEFA

Komponente 3: TRI

Komponente 4: CYCLO

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

PIP: Piperacillin	Sigma	Art. Nr. P8396
CEFA: Cefoperazon	Sigma	Art. Nr. C4292
TRI: Trimethoprim	Sigma	Art. Nr. T7883
CYCLO: Cycloheximide	Sigma	Art. Nr. C7698

**Supplement(e): keine**

**Herstellung:**

1. PIP: 32 mg Piperacillin in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren
  2. CEFA: 16 mg Cefoperazon in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren
  3. TRI: 20 mg Trimenthoprim in Ethanol/Wasser-Gemisch (4 ml 96 % Ethanol + 6 ml dest. **H<sub>2</sub>O**) lösen und sterilfiltrieren
  4. CYCLO: 100 mg Cycloheximid in 10 ml dest. **H<sub>2</sub>O** lösen und sterilfiltrieren
- Die Lösungen sind vier Wochen haltbar!

**Bezeichnung:)** *Arcobacter* Selektiv Bouillon zur Isolierung von *Arcobacter* nach Houf et al.

**Kurzform:** AHB

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Arcobacter</i> Bouillon	AB	CM965 Oxoid
----------------------------	----	-------------

**Supplement(e):**

Lysiertes Pferdeblut 5 %	Oxoid	Art. Nr. SR 48
Amphotericin B-Lösung	Sigma	Art. Nr. A 4888
Cefoperazon-Lösung	Sigma (s. Rezept CEFA)	Art. Nr. C4292
Trimethoprim-Lösung	Sigma (s. Rezept TRI)	Art. Nr. T7883
5-Fluorouracil	Sigma	Art. Nr. F 6627
Novobiocin	Sigma	Art. Nr. N 1628
Brenztraubensäure/Pyruvate	Merck	Art. Nr. 1.06619
Thioglycolate medium	Sigma	Art. Nr. T 9032

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **24 g** *Arcobacter* broth in **900 ml** dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
  - 50 ml lysiertes Pferdeblut zugeben
  - 150 mg 5-Fluorouracil-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 64 mg Trimethoprim-Lösung (in 4 ml 96 % Ethanol + 6 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 20 mg Amphotericin-B-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 32 mg Novobiocin-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 500 mg Brenztraubensäure zugeben (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 500 mg Thioglycolat zugeben (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
  - In Röhrchen à 10 ml abfüllen
-

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Bouillon zur Isolierung von *Arcobacter* nach Johnson und Murano

---

**Kurzform:** AJMB

---

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Brucella</i> broth powder	BD	Art. Nr. 211088
------------------------------	----	-----------------

---

**Supplement(e):**

5-Fluorouracil	Sigma	Art. Nr. F 6627
Activated charcoal	Sigma	Art. Nr. C 7606
Cefoperazon-Lösung	Sigma (s. Rezept CEFA)	Art. Nr. C4292
Brenztraubensäure/Pyruvate	Merck	Art. Nr. 1.06619
Thioglycolate medium	Sigma	Art. Nr. T 9032
Bile salts no. 3 (0.25 %)	Oxoid	Art. Nr. LP 0056

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **24 g** *Brucella* broth powder in **940 ml** dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
    - 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
    - 150 mg 5-Fluorouracil-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
    - 30 g activated charcoal (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
    - 500 mg Pyruvate-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
    - 500 mg Thioglycolate-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
    - 2,5 g Gallensalz no. 3 (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst) zugeben.
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
-

- In Röhrchen à 10 ml abfüllen.
- 
- 

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Bouillon zur Isolierung von *Arcobacter* nach González

---

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Arcobacter</i> broth	AB	CM965 Oxoid
-------------------------	----	-------------

---

**Supplement(e):**

CAT-Supplement	Oxoid	Art. Nr. SR 0174E
5-Fluorouracil	Sigma	Art. Nr. F 6627
Novobiocin	Sigma	Art. Nr. N 1628

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

---

**Herstellung:**

- **24 g** *Arcobacter* broth in **990 ml** dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
  - 1 x CAT-Supplement-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 100 mg 5-Fluorouracil-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 40 mg Novobiocin-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
  - In Röhrchen à 10 ml abfüllen.
-



---

## 2 Nährmedien und Reagenzien für kulturellen Nachweis: Selektive Nährböden

---

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Agar nach de Boer

---

**Kurzform:** ASM

---

Zusammensetzung:

Basisnährboden:

Müller-Hinton broth	Oxoid	Art. Nr. CM 405
Agar Nr. 3	Oxoid	Art. Nr. LP13

---

**Supplement(e):**

Piperacillin-Lösung	Sigma (s. Rezept PIP) Art. Nr. P8396
Cefoperazon-Lösung	Sigma (s. Rezept CEFA) Art. Nr. C4292
Trimethoprim-Lösung	Sigma (s. Rezept TRI) Art. Nr. T7883
Cycloheximide-Lösung	Sigma (s. Rezept CYCLO) Art. Nr. C7698

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- 28 g Müller-Hinton +
  - 25 g Agar Nr. 3 in **960** ml dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15min / 121 °C**
  - auf ca. 43 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der **Supplemente**:
  - 32 mg Piperacillin-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
  - 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
  - 20 mg Trimenthoprim-Lösung (in 4 ml 96 % Ethanol + 6 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
  - 100 mg Cycloheximide-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert)
  - Platten gießen
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
-

---

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Agar zur Isolierung von *Arcobacter* nach Houf

---

**Kurzform:** AHM

---

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Arcobacter</i> Bouillon	AB	CM965 Oxoid	Art. Nr. 211088
Agar Technical no.3	AT3	L13 Oxoid	

---

**Supplement(e):**

Amphotericin B-Lösung	Sigma	Art. Nr. A 4888
Cefoperazon-Lösung	Sigma (s. Rezept CEFA)	Art. Nr. C4292
Trimethoprim-Lösung	Sigma (s. Rezept TRI)	Art. Nr. T7883
5-Fluorouracil	Sigma	Art. Nr. F 6627
Novobiocin	Sigma	Art. Nr. N 1628

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **24 g** *Arcobacter* Bouillon und **12 g** Agar Technical No.3 in **950 ml** dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
  - 150 mg 5-Fluorouracil-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 64 mg Trimethoprim-Lösung (in 4 ml 96 % Ethanol + 6 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 20 mg Amphotericin B-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 32 mg Novobiocin-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
  - In Platten gießen
-

---

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Agar zur Isolierung von *Arcobacter* nach Johnson and Murano

---

**Kurzform:** AJMM

---

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:*

<i>Brucella</i> broth powder	BD	Art. Nr. 211088
Nutrient agar no. 2	Difco	

---

**Supplement(e):**

Lysiertes Pferdeblut 5 %

Cefoperazon-Lösung           Sigma (s. Rezept CEFA) Art. Nr. C4292

Brenztraubensäure/ Pyruvate Merck   Art. Nr. 1.06619

Thioglycolat medium           Sigma   Art. Nr. T 9032

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **24 g** *Brucella* broth powder und **12 g** Nutrient agar no.2 in **920 ml** dest. Wasser lösen
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
  - 50 ml lysiertes Pferdeblut zugeben
  - 16 mg Cefoperazon-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 500 mg Pyruvate-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - 500 mg Thioglycolate-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
  - In Platten gießen.
-

**Bezeichnung:** *Arcobacter* Selektiv Agar zur Isolierung von *Arcobacter* nach González (m CIN/ CAT Agar)

---

**Kurzform:** ACM

---

**Zusammensetzung:**

*Basisnährboden:* für mCIN-AGAR

<i>Yersinia selective agar base</i>	Oxoid CM 0653
Hefeextrakt = Yeast extract	Merck 1.03753
Bactoagar	BD 214010
Natriumchlorid	Merck 1.06404
Sodium-Succinate-Hexahydrate	Sigma S 2378
Sodium-L-Glutamate-Monohydrate	Merck 1.06445
Magnesiumchlorid-Hexahydrate	Merck 1.05833
5-Fluorouracil	Sigma Art. Nr. F 6627

---

**Supplement(e):**

CAT-Supplement Oxoid SR 0174E

(Rezepte für PIP, CEFA, TRI, CYCLO siehe Rezept: **Komponenten für ASB/ASM-Medium**)

**Herstellung:**

- **58.0 g** *Yersinia selective agar base*, **2.5 g** Bactoagar und **3.0 g** yeast extract in **990 ml** dest. Wasser lösen.
  - außerdem **0.8 g** Natriumchlorid,
  - **2.0 g** *sodium succinat hexahydrat*,  
**2.0 g** *sodium L-glutamate monohydrat*,  
**1.0 g** *Magnesium chloride hexahydrat*,  
und **100 mg** 5-Fluorouracil (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst) zugeben.
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - auf ca. 55 °C abkühlen lassen
  - sterile Zugabe der Supplemente:
  - CAT-Supplement-Lösung:
-

- 1 x CAT-Supplement-Lösung (in 10 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst)
  - pH-Wert messen: Soll **7,0 +/- 0,2** (bei ca. 25 °C)
  - In Platten gießen
- 

### **3 Nährmedien und Reagenzien für kulturellen Nachweis: Nährboden für Subkulturen**

---

**Bezeichnung:** Trypton-Soja-Agar

---

**Kurzform:** TSA

---

**Zusammensetzung:**

Basisnährboden: Neutralised Soya Peptone	z. B. Oxoid L44
Trypton	z. B. Oxoid LP 0042
Agar-Agar	z.B. Merck 1.01614.
Sodium chloride	z.B. Merck 1.06404.

---

**Supplement(e): Keine**

**Herstellung:**

- **5,0 g** Soyapeptone
  - **+ 15,0 g** Trypton
  - **+ 5,0 g** sodium chloride
  - **+ 15,0 g** Agar-Agar
  - in **1000** ml demin. Wasser lösen
  
  - autoklavieren: **15 min / 121 °C**
  - **in Platten gießen**
  - pH-Wert kontrollieren: **7,3 +/- 0,2** (bei ca. **25 °C**)
- 

Blutagar-Platten

OXOID

## 4 Nährmedien und Reagenzien für Screening- und m-PCR

### Probenaufbereitung

PrepMan™ Ultra Reagenz APPLIED BIOSYSTEMS

### DNA-Polymerase

Hot StarTaq Master Mix Kit Qiagen

### Primer

Primer Design HERMANN

### Elektrophorese

Agarose Biozym LE Agarose BIOZYM

Tris-Acetat-EDTA Puffer SIGMA

Ethidiumbromid,  
wässrige, gebrauchsfertige Lösung 1 mg/ml FLUKA

### Gel Ladepuffer

Zusammensetzung:  
62,5 mg Bromphenolblau, 62,5 mg Xylencyanol, 6,25  
g Ficoll (Typ 400), ad 25 ml Wasser dest.

0,9 %ige NaCl-Lösung MERCK, 1.06404

Zusammensetzung:

Natriumchlorid 9,0 g

Zubereitung:  
9,0 g Natriumchlorid in demin. Wasser auflösen,  
pH-Wert einstellen:  $6,0 \pm 0,2$  (bei 25 °C)  
15 min bei 121 °C autoklavieren  
pH-Wert kontrollieren:  $6,0 \pm 0,2$  (bei 25 °C)

### Mikroaerobe Bebrütung

CampyGen Packung OXOID

## 5 Geräte und Laborbedarf

### 5.1 Laborgeräte-Grundausrüstung

Waagen

Elektronische Präzisionswaage LA 5200 P-OCE	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage BP 2100	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage LA 2200S-OCE	SARTORIUS
Elektronische Präzisionswaage YDP03-OCE	SARTORIUS

Thermomixer

Thermomixer comfort	EPPENDORF
---------------------	-----------

Verdünnungsautomat

Bioflow SynergA	KIESTRALAB AUTOMATION
-----------------	-----------------------

Stomacher

Bagmixer 400 P	INTERSCIENCE
----------------	--------------

Reagenzglasmixer

Vortex 7-2020	NEOLAB
---------------	--------

<u>Vortexer</u>	MERCK
-----------------	-------

Kühlschrank

FKS 5000	LIEBHERR
----------	----------

Aqualytic 200031	LIEBHERR
------------------	----------

Pipetten

Glaspipette 1 0ml/0, 1 ml/Ex+1 5s 200C ± 0,05ml	FORTUNA
---	---------

Demeterpipette 200C	DINKELBERG
---------------------	------------

Pipettierhilfe

macro	BRAND
-------	-------

Eppendorf Pipette reference	EPPENDORF
-----------------------------	-----------

Zubehör für Eppendorf Geräte

Eppendorf tubes 2 ml safe lock	EPPENDORF
--------------------------------	-----------

<u>Einmalspitzen gestopft</u> Tip One 1-100 µl	STARLAB
--	---------

Tip One 101-1000 µl

Tip One 0,5-10 µl

Kühlbrutschränke

KB 53	WTB BINDER
KB 115	WTB BINDER
KB 240	WTB BINDER
KB 720	WTB BINDER

Kartuschenbrenner

Soudogaz 2000 PZ	CAMPIGAZ
------------------	----------

Stomacherbeutel

Bagfilter	INTERSCIENCE
-----------	--------------

Sicherheitswerkbank

HS12	KENDRO
Mikroaerobe Werkbank MACS-VA 500	dw Scientific

Autoklaven

5075 ELV	TUTTNAUER CO LTD.
5075 EL	TUTTNAUER CO LTD.

Sterilisator

Sterilisator FED 240	WTB-BINDER
----------------------	------------

Reagenzgläser

0 16 mm / L 160 mm	MERCK / VWR
--------------------	-------------

Aufbewahrungsgefäße

Erlenmeyerkolben 500 ml 25/500 ks	SIMAX KAVALIER
-----------------------------------	----------------

Abdeckungen

Alufolie 0 ca. 15 cm, Dicke 0,03 mm	NEOLAB
Parafilm M	NEOLAB

Kryo-Aufbewahrungsboxen

NEOLAB

Petrischalen

92 x 16 mm mit Nocken No./Ref 82.1473	SARSTEDT
---------------------------------------	----------

Handschuhe

Einmal-Handschuhe Latexhandschuh puderfrei, Gel-Beschichtung	JFM JOSEF F MÜLLER GMBH
--	-------------------------



Einmal-Handschuhe Nitril, puderfrei	MICROFLEX
<u>Kühlraum</u>	
Kühlanlage R404A	DOSTER GMBH
<u>pH-Messgerät mit Tischdrucker</u>	
pH-Meter 765	KNICK
<u>Tischdrucker PS-180</u>	GMF
<u>Wasserbad</u>	
ETR 452825	DINKELBERG LABORTECHNIK
<u>Magnetrührer mit Heizplatte</u>	
IKA-Combimag RCT	IKA-WERKE
IKA-Mag REO	IKA-WERKE
<u>Trockenschrank</u>	
Trockenschrank	MEMMERT
<u>Dosierfix</u>	
Dosierfix	WELATEC
<u>Abfüllautomat mit Druckeinrichtung</u>	
Abfüllautomat MP 1000	NEW BRUNSWICK SCI.
Tintenstrahldrucker A 100 (für Petrischalen)	DOMINO AMJET GMBH
<u>Aufbewahrungsmedium</u>	
Mikrobank 1 Cryobank	MAST DIAGNOSTICA
Mikrobank / Cryobank Kryoröhrchen	
<u>Spiralplater</u>	SPIRAL BIOTECH
Autoplate 4000	(Norwood USA)
<b>5.2 Spezialanschaffungen für die PCR</b>	
<u>ffun PCR-Werkbank</u>	
PCR-Werkbank aura	BIOAIR
<u>PCR-tubes und Reaktionsgefäße</u>	
Thin Wall 8Tube Strip	APPLIED BIOSYSTEMS

Mikro Amp Tray	BIOZYM
<u>Zentrifuge</u>	
Biofuge pico	HERAEUS
<u>Reagenzglasmixer</u>	
Reagenzglasmixer Heidolph	NEOLAB
<u>Thermocycler</u>	
Thermocycler Gene Amp PCR-System 2400	APPLIED BIOSYSTEMS
Thermocycler Gene Amp PCR-System 2700	APPLIED BIOSYSTEMS
Thermocycler Gene Amp PCR-System 2720	APPLIED BIOSYSTEMS
<u>Elektrophoresekammern</u>	
Elektrophoresekammer Agargel Maxi mit Standard Power Pack P25	BIOMETRA
Elektrophoresekammer Agargel Maxi mit Elektrophoresis Power Supply EPS 601	BIOTECH
<u>Dokumentationseinheit</u>	
Dokumentationseinheit Bio Doc II mit Kamera, PC und Bearbeitungssoftware	BIOMETRA
<u>Drucker</u>	
Fotodrucker Digital Graphic printer UP-D 890	SONY

## 6 Übersichtstabellen und Abbildungen zu den Untersuchungen

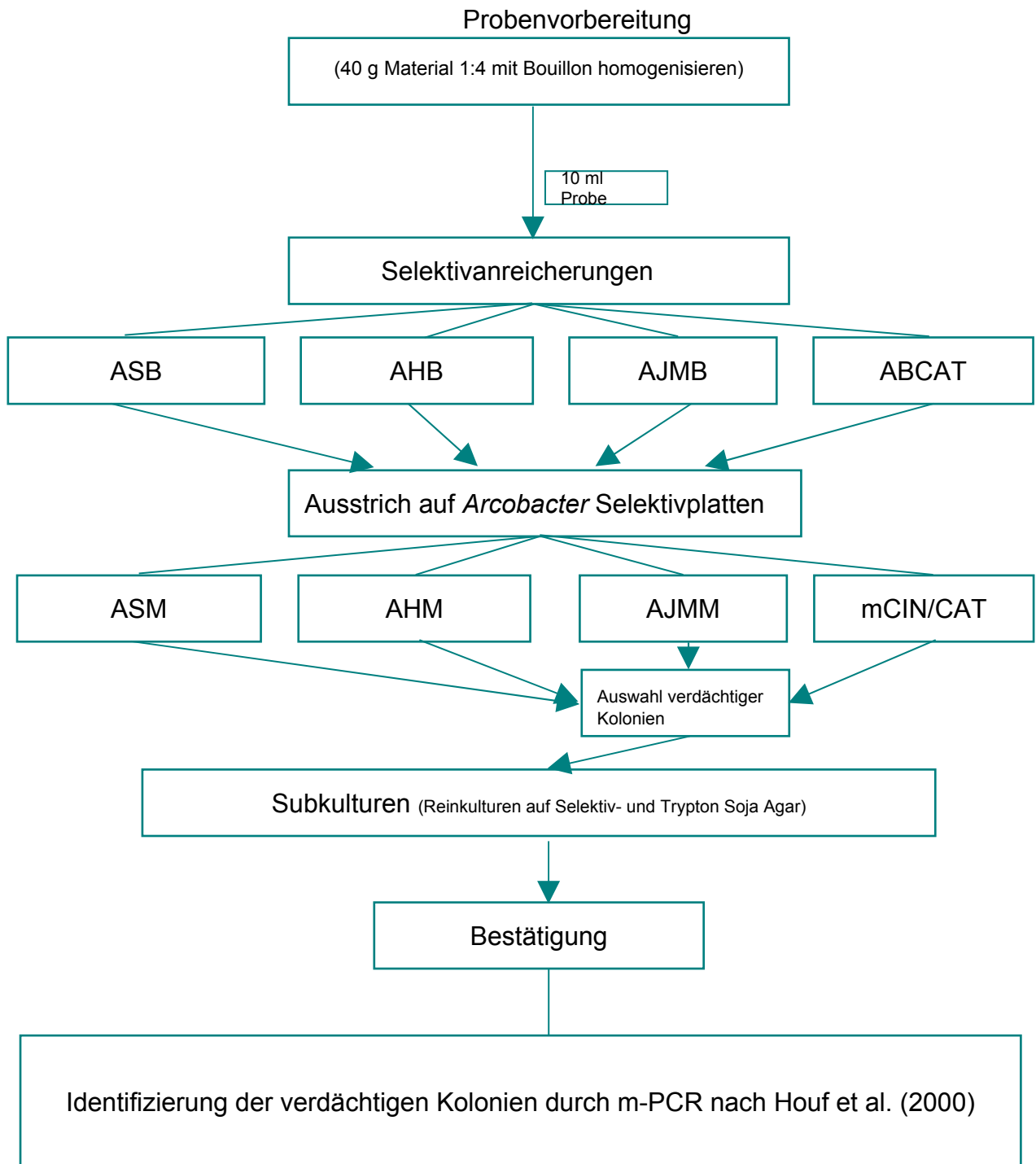


Abbildung 3: Nachweis von *Arcobacter* mit kulturellen Methoden

mASB = *Arcobacter* Selektiv Bouillon  
 mAHB = *Arcobacter* Houf Bouillon  
 mAJMB = *Arcobacter* Johnson Murano Bouillon  
 mABCAT = *Arcobacter* Bouillon mit CAT  
 CAT= Cefoperazon, Amphotericin B, Teicoplanin Supplement

mASM = *Arcobacter* Selektiv Medium  
 mAHM = *Arcobacter* Houf Medium  
 mAJMM = *Arcobacter* Johnson Murano Medium  
 mCIN/CAT= *Arcobacter* Medium nach Collins  
 m= modifiziert

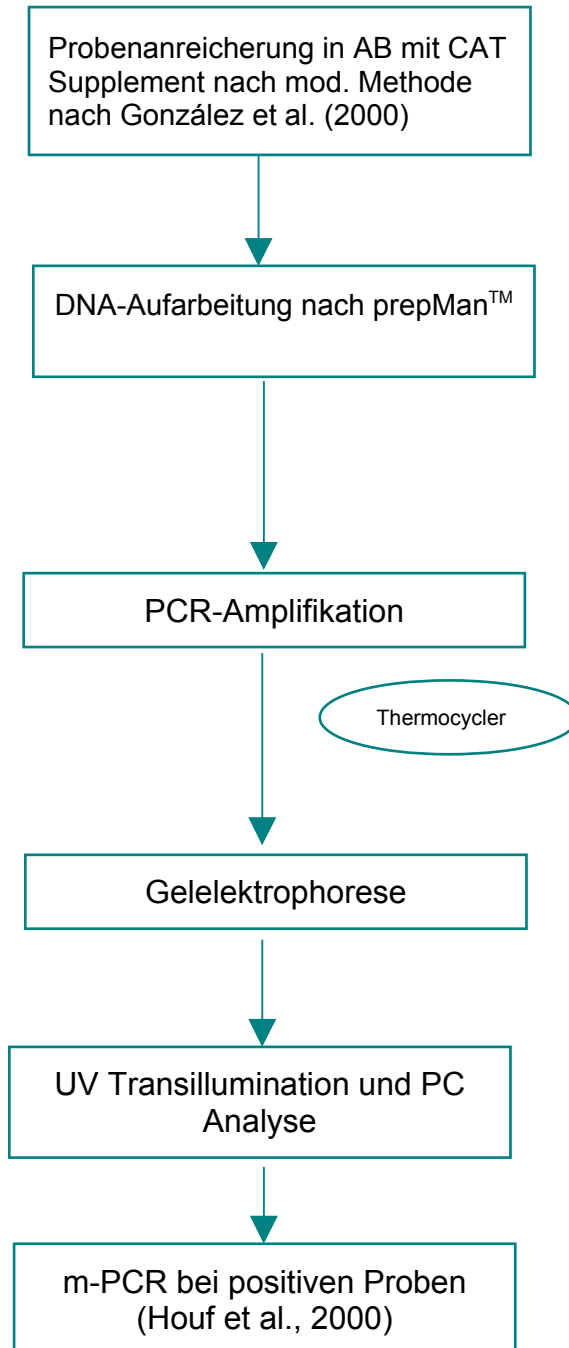


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs der PCR nach González et al. (2000)

AB= *Arcobacter* Bouillon (Oxid)  
CAT= Cefoperazon, Amphotericin B, Teicoplanin Supplement  
mod. = modifiziert

## DNA-Probe für den *Arcobacter*-Nachweis Probenaufarbeitung nach der PrepMan™ ULTRA Methode

Generell wurde das linke Aufarbeitungsschema verwendet und nur für den schnellen Screening-PCR-Nachweis zum Vergleich

das rechte Schema:

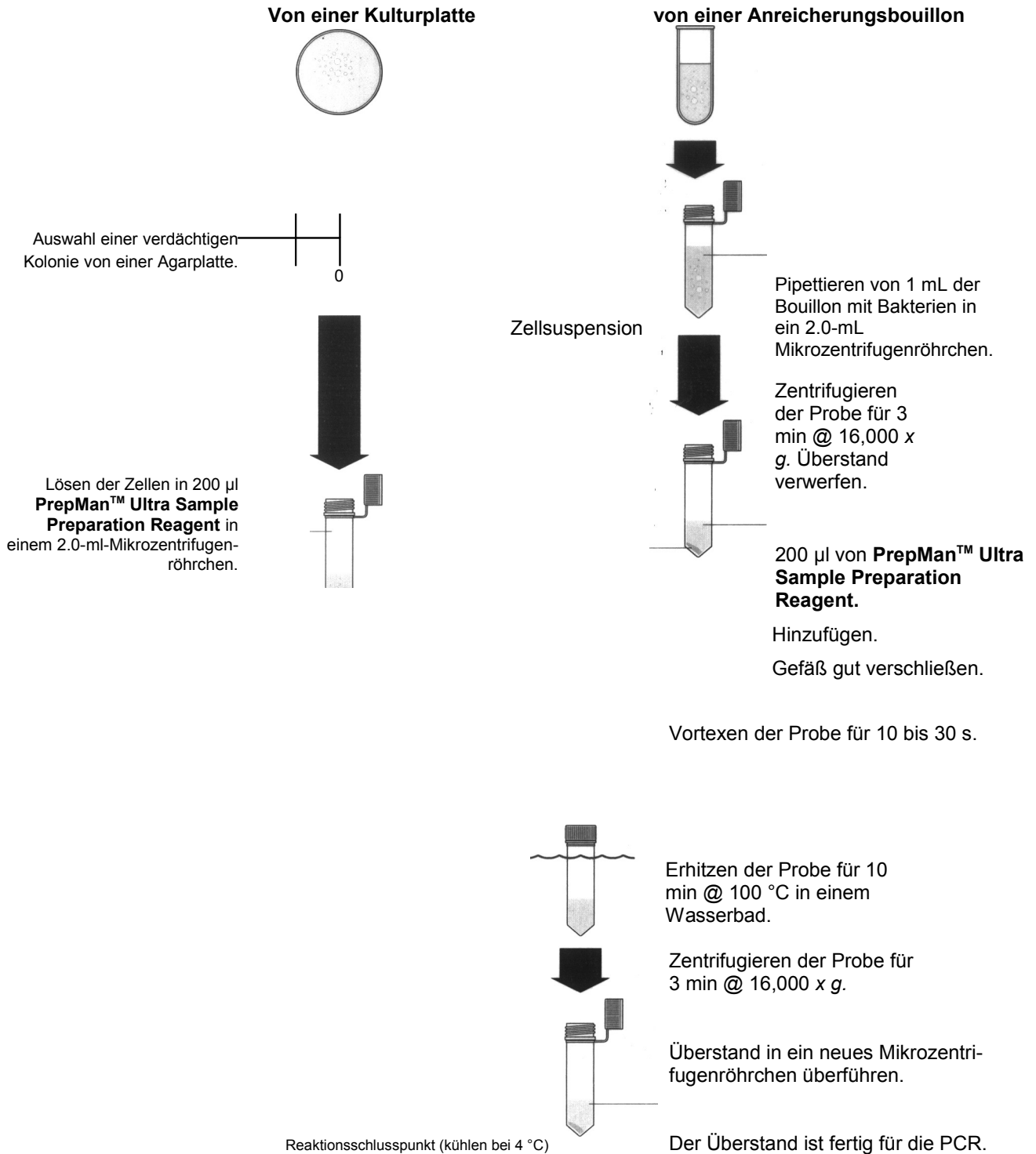


Abbildung 5: Probenaufarbeitung nach der PrepMan™ ULTRA Methode

Tabelle 20: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode de Boer et al. (1996)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Cefoperazon 50mg/l	Cefoperazon 32mg/l	Cefoperazon 16mg/l	Piperacillin 100mg/l	Piperacillin 75mg/l	Piperacillin 32mg/l
16h	2.21x10 <sup>7</sup>	1.38x10 <sup>7</sup>	1.52x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>	4.00x10 <sup>5</sup>	4.80x10 <sup>5</sup>	7.20x10 <sup>5</sup>
24h	5.82x10 <sup>8</sup>	4.00x10 <sup>7</sup>	4.36x10 <sup>7</sup>	4.73x10 <sup>7</sup>	4.40x10 <sup>6</sup>	5.20x10 <sup>6</sup>	1.38x10 <sup>7</sup>
48h	2.47x10 <sup>11</sup>	8.09x10 <sup>9</sup>	1.91x10 <sup>10</sup>	2.31x10 <sup>10</sup>	6.40x10 <sup>9</sup>	7.20x10 <sup>9</sup>	1.65x10 <sup>10</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>							
16h	1.38x10 <sup>7</sup>	3.28x10 <sup>5</sup>	1.38x10 <sup>6</sup>	1.66x10 <sup>6</sup>	-	4.00x10 <sup>4</sup>	1.81x10 <sup>6</sup>
24h	2.14x10 <sup>8</sup>	3.49x10 <sup>6</sup>	1.52x10 <sup>7</sup>	2.40x10 <sup>7</sup>	-	4.40x10 <sup>5</sup>	2.80x10 <sup>6</sup>
48h	1.65x10 <sup>11</sup>	4.15x10 <sup>8</sup>	6.55x10 <sup>8</sup>	1.01x10 <sup>9</sup>	-	5.90x10 <sup>8</sup>	2.18x10 <sup>9</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>							
16h	4.00x10 <sup>3</sup>	2.18x10 <sup>2</sup>	3.08x10 <sup>2</sup>	2.18x10 <sup>3</sup>	-	3.64x10 <sup>2</sup>	1.38x10 <sup>3</sup>
24h	4.80x10 <sup>4</sup>	2.40x10 <sup>3</sup>	3.64x10 <sup>3</sup>	2.62x10 <sup>4</sup>	-	4.00x10 <sup>3</sup>	1.52x10 <sup>4</sup>
48h	1.21x10 <sup>6</sup>	2.94x10 <sup>5</sup>	6.91x10 <sup>5</sup>	9.43x10 <sup>5</sup>	-	1.55x10 <sup>5</sup>	8.76x10 <sup>5</sup>

Tabelle 21: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode Houf et al. (2001)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Amphotericin B 30mg/l	Amphotericin B 20mg/l	Amphotericin B 10mg/l	5- Fluorouracil 200mg/l	5- Fluorouracil 150mg/l	5- Fluorouracil 100mg/l
16h	2.21x10 <sup>7</sup>	1.55x10 <sup>7</sup>	1.81x10 <sup>7</sup>	1.81x10 <sup>7</sup>	1.35x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>	1.85x10 <sup>7</sup>
24h	5.82x10 <sup>8</sup>	4.00x10 <sup>7</sup>	5.09x10 <sup>7</sup>	5.09x10 <sup>7</sup>	4.00x10 <sup>8</sup>	4.40x10 <sup>8</sup>	4.40x10 <sup>8</sup>
48h	2.47x10 <sup>11</sup>	1.65x10 <sup>9</sup>	2.40x10 <sup>9</sup>	2.40x10 <sup>9</sup>	1.38x10 <sup>11</sup>	2.14x10 <sup>11</sup>	2.14x10 <sup>11</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>							
16h	1.38x10 <sup>7</sup>	6.18x10 <sup>6</sup>	8.00x10 <sup>6</sup>	8.00x10 <sup>6</sup>	1.01x10 <sup>7</sup>	1.15x10 <sup>7</sup>	1.15x10 <sup>7</sup>
24h	2.14x10 <sup>8</sup>	6.55x10 <sup>7</sup>	8.79x10 <sup>7</sup>	8.09x10 <sup>7</sup>	1.15x10 <sup>8</sup>	1.98x10 <sup>8</sup>	1.98x10 <sup>8</sup>
48h	1.65x10 <sup>11</sup>	4.00x10 <sup>9</sup>	1.65x10 <sup>10</sup>	1.01x10 <sup>10</sup>	1.01x10 <sup>11</sup>	1.55x10 <sup>11</sup>	1.55x10 <sup>11</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>							
16h	4.00x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
24h	4.80x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-
48h	1.21x10 <sup>6</sup>	6.18x10 <sup>4</sup>	6.91x10 <sup>4</sup>	6.91x10 <sup>4</sup>	8.00x10 <sup>5</sup>	1.01x10 <sup>6</sup>	1.08x10 <sup>6</sup>

Tabelle 22: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode Johnson-Murano (1999)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Cefoperazon 50mg/l	Cefoperazon 32mg/l	Cefoperazon 16mg/l	5- Fluorouracil 200mg/l	5- Fluorouracil 150mg/l	5- Fluorouracil 100mg/l
16h	$2.21 \times 10^7$	$1.38 \times 10^7$	$1.52 \times 10^7$	$1.80 \times 10^7$	$1.35 \times 10^7$	$1.80 \times 10^7$	$1.85 \times 10^7$
24h	$5.82 \times 10^8$	$4.40 \times 10^7$	$4.40 \times 10^7$	$4.80 \times 10^7$	$4.00 \times 10^8$	$4.40 \times 10^8$	$4.40 \times 10^8$
48h	$2.47 \times 10^{11}$	$7.80 \times 10^9$	$2.14 \times 10^{10}$	$3.64 \times 10^{10}$	$1.55 \times 10^{11}$	$2.14 \times 10^{11}$	$2.14 \times 10^{11}$
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>							
16h	$1.38 \times 10^7$	$2.14 \times 10^5$	$1.01 \times 10^6$	$2.21 \times 10^6$	$1.01 \times 10^7$	$1.15 \times 10^7$	$1.81 \times 10^7$
24h	$2.14 \times 10^8$	$2.31 \times 10^6$	$6.40 \times 10^6$	$2.47 \times 10^7$	$1.15 \times 10^8$	$1.98 \times 10^8$	$2.14 \times 10^8$
48h	$1.65 \times 10^{11}$	$2.40 \times 10^9$	$6.00 \times 10^9$	$1.01 \times 10^{10}$	$1.01 \times 10^{11}$	$1.08 \times 10^{11}$	$1.55 \times 10^{11}$
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>							
16h	$4.00 \times 10^3$	$2.18 \times 10^2$	$3.08 \times 10^2$	$2.18 \times 10^3$	-	-	-
24h	$4.80 \times 10^4$	$2.40 \times 10^3$	$3.64 \times 10^3$	$2.62 \times 10^4$	$1.91 \times 10^1$	$2.14 \times 10^1$	$2.64 \times 10^1$
48h	$1.21 \times 10^6$	$2.94 \times 10^5$	$6.91 \times 10^5$	$9.43 \times 10^5$	$8.00 \times 10^5$	$1.01 \times 10^6$	$1.08 \times 10^6$

Tabelle 23: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode González et al. (2000)  
(mikroaerob)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Nur CAT- Supplement	Zusätzlich 40mg/l Novobiocin und 100mg/l Fluorouracil	Zusätzlich 60mg/l Novobiocin und 150mg/l Fluorouracil
16h	$2.21 \times 10^7$	$1.01 \times 10^7$	$1.01 \times 10^7$	$4.40 \times 10^6$
24h	$5.82 \times 10^8$	$2.14 \times 10^7$	$2.07 \times 10^7$	$4.73 \times 10^6$
48h	$2.47 \times 10^{11}$	$9.43 \times 10^{10}$	$9.59 \times 10^{10}$	$7.20 \times 10^9$
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>				
16h	$1.38 \times 10^7$	$5.82 \times 10^6$	$5.82 \times 10^6$	$4.00 \times 10^6$
24h	$2.14 \times 10^8$	$6.90 \times 10^6$	$6.18 \times 10^6$	$4.36 \times 10^6$
48h	$1.65 \times 10^{11}$	$5.20 \times 10^7$	$4.80 \times 10^7$	$6.18 \times 10^6$
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>				
16h	$4.00 \times 10^3$	$6.74 \times 10^1$	$6.74 \times 10^1$	-
24h	$4.80 \times 10^4$	$8.79 \times 10^1$	$8.76 \times 10^1$	-
48h	$1.21 \times 10^6$	$5.82 \times 10^2$	$5.80 \times 10^2$	$1.55 \times 10^1$

Tabelle 24: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode González et al. (2000)  
(mikroaerob und aerob)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Nur CAT- Supplement	Zusätzlich 40mg/l Novobiocin und 100mg/l Fluorouracil	Zusätzlich 60mg/l Novobiocin und 150mg/l Fluorouracil
16h mikroa.	2.21x10 <sup>7</sup>	1.01x10 <sup>7</sup>	1.01x10 <sup>7</sup>	4.40x10 <sup>6</sup>
40h aerob	2.18x10 <sup>9</sup>	7.20x10 <sup>8</sup>	7.20x10 <sup>8</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>
64h aerob	2.47x10 <sup>15</sup>	7.80x10 <sup>12</sup>	7.20x10 <sup>12</sup>	1.20x10 <sup>8</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>				
16h mikroa.	1.38x10 <sup>7</sup>	5.82x10 <sup>6</sup>	5.82x10 <sup>6</sup>	4.00x10 <sup>5</sup>
40h aerob	2.14x10 <sup>9</sup>	7.20x10 <sup>8</sup>	7.00x10 <sup>8</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>
64h aerob	1.65x10 <sup>15</sup>	7.00x10 <sup>12</sup>	7.00x10 <sup>12</sup>	6.91x10 <sup>6</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>				
16h mikroa.	4.00x10 <sup>3</sup>	6.74x10 <sup>2</sup>	6.74x10 <sup>2</sup>	-
40h aerob	4.80x10 <sup>4</sup>	8.79x10 <sup>3</sup>	8.76x10 <sup>3</sup>	1.55x10 <sup>1</sup>
64h aerob	1.21x10 <sup>8</sup>	6.74x10 <sup>6</sup>	6.80x10 <sup>6</sup>	1.93x10 <sup>3</sup>

Tabelle 25: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode de Boer et al. (1996)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	Cefoperazon 50mg/l	Cefoperazon 32mg/l	Cefoperazon 16mg/l	Piperacillin 100mg/l	Piperacillin 75mg/l	Piperacillin 32mg/l
16h	2.21x10 <sup>7</sup>	1.52x10 <sup>7</sup>	1.52x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>	3.64x10 <sup>6</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>	4.40x10 <sup>6</sup>
24h	5.82x10 <sup>8</sup>	3.64x10 <sup>7</sup>	4.73x10 <sup>7</sup>	6.40x10 <sup>7</sup>	1.55x10 <sup>7</sup>	4.40x10 <sup>7</sup>	1.98x10 <sup>8</sup>
48h	2.47x10 <sup>11</sup>	1.55x10 <sup>10</sup>	1.98x10 <sup>10</sup>	4.40x10 <sup>10</sup>	4.00x10 <sup>9</sup>	4.73x10 <sup>9</sup>	1.55x10 <sup>11</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>							
16h	1.38x10 <sup>7</sup>	1.38x10 <sup>6</sup>	1.91x10 <sup>6</sup>	6.40x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>3</sup>	4.40x10 <sup>3</sup>	1.55x10 <sup>4</sup>
24h	2.14x10 <sup>8</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>	4.00x10 <sup>7</sup>	7.80x10 <sup>7</sup>	6.40x10 <sup>5</sup>	7.20x10 <sup>5</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>
48h	1.65x10 <sup>11</sup>	1.55x10 <sup>9</sup>	1.91x10 <sup>9</sup>	6.91x10 <sup>9</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>	5.90x10 <sup>8</sup>	2.18x10 <sup>9</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>							
16h	4.00x10 <sup>3</sup>	2.18x10 <sup>2</sup>	3.08x10 <sup>2</sup>	2.18x10 <sup>3</sup>	1.55x10 <sup>1</sup>	2.40x10 <sup>2</sup>	6.80x10 <sup>3</sup>
24h	4.80x10 <sup>4</sup>	2.40x10 <sup>3</sup>	3.64x10 <sup>3</sup>	2.62x10 <sup>4</sup>	1.55x10 <sup>1</sup>	4.00x10 <sup>2</sup>	7.20x10 <sup>3</sup>
48h	1.21x10 <sup>6</sup>	2.94x10 <sup>5</sup>	6.91x10 <sup>5</sup>	9.43x10 <sup>5</sup>	4.00x10 <sup>3</sup>	7.80x10 <sup>3</sup>	4.40x10 <sup>5</sup>



Tabelle 26: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode Houf et al. (2001)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	5-Fluorouracil 200mg/l	5-Fluorouracil 150mg/l	5-Fluorouracil 100mg/l	Ampho- tericin B 30mg/l	Ampho- tericin B 20mg/l	Ampho- tericin B 10mg/l
16h	2.21x10 <sup>7</sup>	1.55x10 <sup>7</sup>	1.98x10 <sup>7</sup>	1.98x10 <sup>7</sup>	1.38x10 <sup>7</sup>	1.52x10 <sup>7</sup>	1.66x10 <sup>7</sup>
24h	5.82x10 <sup>8</sup>	4.36x10 <sup>8</sup>	4.80x10 <sup>8</sup>	4.80x10 <sup>8</sup>	1.66x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>	1.80x10 <sup>7</sup>
48h	2.47x10 <sup>11</sup>	1.55x10 <sup>11</sup>	1.91x10 <sup>11</sup>	1.91x10 <sup>11</sup>	8.00x10 <sup>9</sup>	8.79x10 <sup>9</sup>	8.79x10 <sup>9</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>							
16h	1.38x10 <sup>7</sup>	1.38x10 <sup>6</sup>	1.66x10 <sup>6</sup>	1.80x10 <sup>6</sup>	3.64x10 <sup>6</sup>	4.73x10 <sup>6</sup>	4.73x10 <sup>6</sup>
24h	2.14x10 <sup>8</sup>	1.80x10 <sup>6</sup>	1.93x10 <sup>6</sup>	1.80x10 <sup>6</sup>	4.00x10 <sup>6</sup>	5.09x10 <sup>6</sup>	5.09x10 <sup>6</sup>
48h	1.65x10 <sup>11</sup>	8.00x10 <sup>10</sup>	9.59x10 <sup>10</sup>	9.59x10 <sup>10</sup>	7.80x10 <sup>9</sup>	1.55x10 <sup>10</sup>	1.55x10 <sup>10</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>							
16h	4.00x10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
24h	4.80x10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-
48h	1.21x10 <sup>6</sup>	4.00x10 <sup>5</sup>	4.80x10 <sup>5</sup>	4.80x10 <sup>5</sup>	7.20x10 <sup>4</sup>	1.55x10 <sup>5</sup>	1.55x10 <sup>5</sup>

Tabelle 27: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode González et al. (2000)  
(mikroaerob)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	1.50 mg/l NaCl	0.80 mg/l NaCl	5-Fluorouracil 200mg/l	5-Fluorouracil 100mg/l
16h	2.21x10 <sup>7</sup>	9.43x10 <sup>6</sup>	1.01x10 <sup>7</sup>	1.01x10 <sup>6</sup>	1.08x10 <sup>6</sup>
24h	5.82x10 <sup>8</sup>	9.43x10 <sup>6</sup>	1.08x10 <sup>7</sup>	1.15x10 <sup>6</sup>	1.15x10 <sup>6</sup>
48h	2.47x10 <sup>11</sup>	8.76x10 <sup>8</sup>	1.21x10 <sup>10</sup>	6.91x10 <sup>10</sup>	1.01x10 <sup>11</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>					
16h	1.38x10 <sup>7</sup>	6.80x10 <sup>6</sup>	7.20x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>
24h	2.14x10 <sup>8</sup>	6.80x10 <sup>6</sup>	7.80x10 <sup>6</sup>	1.81x10 <sup>6</sup>	1.81x10 <sup>6</sup>
48h	1.65x10 <sup>11</sup>	6.91x10 <sup>8</sup>	1.55x10 <sup>10</sup>	6.18x10 <sup>10</sup>	6.55x10 <sup>10</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>					
16h	4.00x10 <sup>3</sup>			1.01x10 <sup>1</sup>	1.01x10 <sup>1</sup>
24h	4.80x10 <sup>4</sup>			1.08x10 <sup>1</sup>	1.15x10 <sup>8</sup>
48h	1.21x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>4</sup>	5.20x10 <sup>5</sup>	4.40x10 <sup>5</sup>	4.80x10 <sup>5</sup>

Tabelle 28: veränderte antimikrobielle Zusätze Methode González et al. (2000)  
(mikroaerob und aerob)

Inkubation Zeit (h)	Kontrollstamm <i>A. butzleri</i>	1.50 mg/l NaCl	0.80 mg/l NaCl	5-Fluorouracil 200mg/l	5-Fluorouracil 100mg/l
16h mikroa.	2.21x10 <sup>7</sup>	9.43x10 <sup>6</sup>	1.01x10 <sup>7</sup>	1.01x10 <sup>6</sup>	1.08x10 <sup>6</sup>
40h aerob	2.18x10 <sup>9</sup>	7.20x10 <sup>8</sup>	1.08x10 <sup>9</sup>	1.15x10 <sup>9</sup>	1.15x10 <sup>9</sup>
64h aerob	2.47x10 <sup>15</sup>	6.18x10 <sup>13</sup>	1.55x10 <sup>14</sup>	1.28x10 <sup>14</sup>	1.28x10 <sup>14</sup>
Kontrollstamm <i>A. cryaerophilus</i>					
16h mikroa.	1.38x10 <sup>7</sup>	6.80x10 <sup>6</sup>	7.20x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>	1.55x10 <sup>6</sup>
40h aerob	2.14x10 <sup>9</sup>	6.91x10 <sup>8</sup>	7.80x10 <sup>8</sup>	1.01x10 <sup>9</sup>	1.08x10 <sup>9</sup>
64h aerob	1.65x10 <sup>15</sup>	5.45x10 <sup>13</sup>	1.01x10 <sup>14</sup>	1.01x10 <sup>14</sup>	1.08x10 <sup>14</sup>
Kontrollstamm <i>A. skirrowii</i>					
16h mikroa.	4.00x10 <sup>3</sup>	-	-	1.01x10 <sup>1</sup>	1.01x10 <sup>1</sup>
40h aerob	4.80x10 <sup>4</sup>	1.55x10 <sup>4</sup>	5.20x10 <sup>4</sup>	1.08x10 <sup>4</sup>	1.15x10 <sup>4</sup>
64h aerob	1.21x10 <sup>8</sup>	7.80x10 <sup>6</sup>	5.45x10 <sup>7</sup>	5.82x10 <sup>7</sup>	6.18x10 <sup>7</sup>

Tabelle 29: Ergebnisse DNA-Aufarbeitung nach González et al. (2000)

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3			Versuch 4		
	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>
<i>A. butzleri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>A. cryaerophilus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>A. skirrowii</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i> , <i>A. skirrowii</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

+= schwach positiv, +++= deutlich positiv, -= negativ  
Negative Kontrollen wurden in die Versuche miteinbezogen.

Tabelle 30: Ergebnisse DNA-Aufarbeitung nach PrepMan™ (2002)

	Versuch 1			Versuch 2			Versuch 3			Versuch 4		
	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>	kbE x 10 <sup>2</sup>	kbE x 10 <sup>3</sup>	kbE x 10 <sup>4</sup>
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	+	++	+	+	++	-	+	++	+	+	++
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	-	++	++	+	++	++	-	-	++	-	+	++
<i>Arcobacter skirrowii</i>	-	+	+	-	+	++	-	-	++	-	+	++
<i>A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii</i>	+	+	++	+	+	++	-	+	++	+	+	++

+ = schwach positiv, ++ = deutlich positiv, - = negativ

Tabelle 31: Detailübersicht der untersuchten Geflügelproben

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/000078/002	Gokko Putenbrust frisch	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000314/001	Hähnchenbrustfilet	EH Italien	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000609/001	Entenbrustfilet	EH Frankreich	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000658/001	Entenbrustfilet	EH Frankreich	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000657/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
06/000607/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000607/002	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000773/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000774/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/000762/001	Barbarie-Entenbrust	EH Frankreich	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/000776/001	Barbarie-Entenbrustfilet	EH Frankreich	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000906/001	Gänsebrust	EH Polen (152)	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/000975/001	Bio Hähnchenbrust	Bio Markt Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/000947/001	Hähnchenbrustfilet	Landwirt Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/001029/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/001029/002	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn



<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/004355/001	Putenbrustfilet	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/004644/001	Putenbrust	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005163/001	Putenschnitzel	Metzgerei Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005304/001	Putenbrustschnitzel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/005171/001	Gänsebrust	EH Ungarn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005362/001	Putenbrust frisch	Metzgerei Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/006868/001	Putenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/006850/001	Putenbrustfilet frisch	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/006850/002	Putenbrustfilet frisch	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/006864/001	Putenschnitzel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/006085/001	Gänsebrust	EH Ungarn	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005594/001	Wiesenhof Hähnchen- Brustfilet	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005591/001	Putenbrustfilet	EH Deutschland	arco A. cry	arco A. cry	arco A. cry	arco A. cry	arco	A. cry
06/005422/001	Hafermast-Gänsebrust	EH Polen	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/005612/001	Gänsebrust	EH Polen	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/006077/001	Gänsebrust von junger Hafermastgans	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/006591/001	Gänsebrust	EH Ungarn (165)	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/007047/001	Hähnchenschlegel	EH Frankreich	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007048/001	Bio Hähnchenschlegel	EH Frankreich	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz A. skirr
06/007049/001	Hähnchenschenkel	Landwirt Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007050/001	Hähnchen	EH Deutschland	nn	nn	arco	nn	arco	A. butz.
06/007050/002	Hähnchen	EH Deutschland	nn	nn	arco	nn	arco	A. butz.
06/007138/001	Hähnchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007138/002	Hähnchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007148/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007288/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007289/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007289/002	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007329/001	Hähnchenschlegel frisch	Metzgereifiliale Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007330/001	Hähnchenschlegel	Treff Imbiss Italien	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007333/001	Hähnchen grillfrisch	Treff Imbiss Italien	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/007335/001	Hähnchen ohne Innereien frisch	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007397/001	Frisches Suppenhuhn	Wochenmarkt Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007399/001	Frisches Hähnchen	Metzgereifiliale Deutschland	nn	arco A. cry	arco A. cry	arco A. cry	arco	A. butz. A. cry





Probe- Nummer	Bezeichnung	Herkunft	Methode de Boer et. al. 1996	Methode Johnson- Murano 1999	Methode González et. al. 2000	Methode Houf et al. 2001	PCR González et. Al. 2000	Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000
06/007982/001	Hähnchen	Schnellgastro- nomie Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/007971/001	Hähnchen-Unterschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/007973/001	Hähnchen	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008311/001	Hähnchen Doppelpack	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008311/002	Hähnchen Doppelpack	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008311/003	Hähnchen Doppelpack	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/8493/001	Hähnchenkeulen	Marktstand Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008521/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	arco A. cry.	arco A. cry.	arco A. cry.	arco	A. butz. A. cry
06/008520/001	Hähnchen	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008498/001	Hähnchenkeulen	Marktstand Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008499/001	Hähnchen	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008502/001	Maishähnchen	Marktstand Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008496/001	Hähnchen	Marktstand Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008509/001	Hähnchen	EH ?	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008745/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008745/002	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008742/001	Hähnchen grillfertig	EH Frankreich	arco A. cry	arco A. cry	arco A. cry	arco A. cry	arco	A. cry

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/008741/001	Hähnchenschenkel frisch	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	Nn
06/008735/001	Hähnchenunterschenkel	EH Deutschland	nn	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/008732/001	Hähnchen frisch	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008727/001	Hähnchenunterschenkel	EH Deutschland	arco A. cry.	arco A. cry.	arco A. cry.	arco A. cry.	arco	A. butz A. cry
06/008728/001	Deutsche Poularde	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/008803/001	Hähnchen-Unterschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/009070/001	Hähnchen-Unterschenkel frisch	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/009325/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/009544/001	Hähnchen-Unterschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010075/001	Dt. Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/010078/001	Dt. Hähnchenoberschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010076/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010146/001	Hähnchenkeule frisch	Metzgerei Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/010108/001	Hähnchenflügel	EH Österreich (151)	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz. A. cry
06/010133/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/010135/001	Hähnchenschlegel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010138/001	Hähnchenunterkeule	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/010434/001	Frikadellen gegart	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	Nn
06/010014/001	Hähnchenkeulen	Fleischerei Deutschland	nn	nn	arco	nn	arco	A. butz
06/010589/001	Hähnchenschlegel	Metzgerei Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. skirr.
06/010028/001	Hähnchenunterschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz
06/009976/001	Hähnchenschenkel mit Rückenstück	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. cry.
06/010010/001	Putenmix zum Braten	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010013/001	Hähnchenkeulen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. cry
06/010007/001	Hähnchenkeulen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/009838/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/009977/001	Hähnchenoberkeule	EH Deutschland	nn	arco	arco	arco	arco	A. skirr.
06/010008/001	Hähnchenkeulen	EH Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. butz.
06/009842/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/009978/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/010791/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. cry.
06/015845/001	Putenmortadella	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/015854/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016137/001	Geflügel-Wiener	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/015149/001	Geflügel-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016217/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/011020/001	Pute	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/014281/001	Hähncheninnenstreifen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/014271/001	Frisches Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/014287/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
06/014526/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	arco A. cry.	arco A. cry.	arco A. cry.	arco	A. butz, cry.
06/014519/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. butz.
06/016183/001	Puten-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016484/001	Geflügelfleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016223/001	Gutfried Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016213/001	Geflügelfleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/015515/001	Hähnchen-Döner	Imbiss ?	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016135/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016135/002	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/015852/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016482/001	Geflügel-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/015801/001	Truthahn-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016127/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016203/001	Hähnchenbrust	EH Deutschland	nn	arco	arco	arco	arco	A. skirr.
06/016077/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/015799/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/015564/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/011071/001	Geflügel-Hacksteak roh	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
06/016676/001	Puten-Zwiebelmettwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016677/001	Geflügelkäsewürstchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016696/001	Geflügel-Wiener	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/016697/001	Geflügel-Wiener Käse Paprika	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017652/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017971/001	Putenschnitzel	EH Deutschland	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
06/017850/001	Puten-Bierwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017972/001	Hendl-Käseknacker	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017852/001	Geflügel-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017851/001	Geflügel-Bratwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode De Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/017849/001	Chicken-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/017328/001	Geflügel-Salami Wittmann	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/018366/001	Geflügel-Wiener Wiesenhof	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/018367/001	Truthahn-Salami	Metzgerei Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/018498/001	Puten-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/018557/001	Truthahnwürstchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/018496/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020335/001	Geflügelfleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020334/001	Puten-Zwiebelmettwurst	Putenräucherei Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020328/001	Geflügel-Pfeffersalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020328/002	Geflügel-Pfeffersalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/019775/001	Geflügel-Bierschinken	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020668/001	Geflügel-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020177/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020323/001	Lyoner	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020901/001	Knoblauch-Geflügel- Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020010/001	Lyoner	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

<b>Probe- Nummer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Methode de Boer et. al. 1996</b>	<b>Methode Johnson- Murano 1999</b>	<b>Methode González et. al. 2000</b>	<b>Methode Houf et al. 2001</b>	<b>PCR González et. Al. 2000</b>	<b>Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000</b>
06/020323/002	Putensalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020669/001	Chicken-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020670/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020011/001	Schinkenwürstchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020807/001	Puten-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020804/001	Geflügel-Fleischwürstchen	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020806/001	Geflügel-Fleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020961/001	Putensalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020769/001	Putensalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020959/001	Geflügel-Wiener	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/020962/001	Geflügel-Fleischwurst	EH Türkei	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/021797/001	Geflügel-Wiener	Gemüse- Obststand ?	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/021661/001	Truthahn-Salami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/021949/001	Putensalami	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/021343/001	Truthahn-Salami	Gemüse- Obststand ?	nn	nn	nn	nn	nn	nn
06/021659/001	Geflügelfleischwurst	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn

Probe- Nummer	Bezeichnung	Herkunft	Methode de Boer et. al. 1996	Methode Johnson- Murano 1999	Methode González et. al. 2000	Methode Houf et al. 2001	PCR González et. Al. 2000	Bestätigung- PCR Houf et. al. 2000
06/021362/001	Geflügel-Wiener Käse Paprika	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
07/000267/001	Hafermastgans	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
07/000347/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	nn	arco A. cry.	nn	arco	A. butz, cry.
07/000427/001	Hähnchenbrustfilet	EH Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. butz, cry.
07/000449/001	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. skirr.
07/001/L1	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.
07/002/L2	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
07/003/L3	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	arco	arco	arco	arco	arco	A. butz.
07/004/L4	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	nn	nn
07/005/L5	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
07/006/L6	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	arco	arco	nn	arco	A. butz.
07/007/L7	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	arco	nn	arco	A. butz.
07/008/L8	Hähnchenschenkel	EH Deutschland	nn	nn	nn	nn	arco	A. butz.

nn= nicht nachgewiesen in der Probe

EH= Einzelhandel



## G Literaturverzeichnis

- ATANASSOVA, V., KESSEN, V., REICH, F. AND KLEIN, G. (2008)  
Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation.  
Journal of Food Protection 71, 2533 – 2536.
- AL RASHID, S. T., DAKUNA, I., LOUIE, H., NG, D., VANDAMME, P., JOHNSON, W. AND CHAN, V. L. (2000)  
Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the glyA Gene.  
Journal of Clinical Microbiology 38, 1488 - 1494.
- ANDERSON, K. F., KIEHLBAUCH, J. A., ANDERSON, D. C., McCLURE, H. M. AND WACHSMUTH, I. K. (1993)  
*Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population.  
Infection Immunity 61, 2220 – 2223.
- ANDERSEN, M., WESLEY, I.V., NESTOR, E. AND TRAMPEL, D. W. (2007)  
Prevalence of *Arcobacter* species in market-weight commercial turkeys.  
Antonie Van Leeuwenhoek 92, 309 – 317.
- ASSANTA, M. A., ROY, D., LEMAY, M.-J. AND MONTPETIT, D. (2002)  
Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces.  
Journal of Food Protection 65, 1240 - 1247.
- ATABAY, H. U. AND CORRY, J. E. L. (1997)  
The prevalence of *campylobacters* and *arcobacters* in broiler chickens.  
Journal of Applied Microbiology 83, 619 - 626.
- ATABAY, H. I. AND CORRY, J. E. L. (1998A)  
Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp.  
International Journal of Food Microbiology 42, 53 - 58.
- ATABAY, H. L., CORRY, J. E. AND ON, S. L. (1998B)  
Diversity and prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens.  
Journal of Applied Microbiology 84, 1007 - 1016.
- ATABAY, H. I. AND AYDIN, F. (2001)  
Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents.  
Letter in Applied Microbiology 33, 430 - 433.

- ATABAY, H. I., AYDIN, F., HOUF, K., SAHIN, M. AND VANDAMME, P. (2003)  
The prevalence of *Arcobacter* spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey and identification of the isolates using SDS-PAGE.  
International Journal of Food Microbiology 25, 21 - 28.
- ATABAY, H.I., UNVER, A., SAHIN, M., OTLU, S., ELMALI, M. AND YAMAN, H. (2008)  
Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese.  
Veterinary Microbiology 128, 400 – 405.
- BOLTON F. J., HUTCHINSON D. N. AND PARKER G. (1988)  
Reassessment of selective agars and filtration techniques for isolation of *Campylobacter* spp. from feces.  
European Journal of Clinical Microbiology 7, 155 - 60.
- COLLINS, C., WESLEY, I. AND MURANO, E. (1996A)  
Detection of *Arcobacter* spp. in ground pork by modified plating methods.  
Journal of Food Protection 5, 448 - 452.
- COLLINS, C. L., MURANO, E. A. AND WESLEY, I. V. (1996B)  
Survival of *Arcobacter butzleri* and *Campylobacter jejuni* After Irradiation Treatment in Vacuum Packaged Ground Pork.  
Journal of Food Protection 59, 1164 - 1166.
- CORRY, J. E. L. AND ATABAY, H. I. (1997)  
Comparison of the productivity of cefoperazone, amphotericin, teicoplanin (CAT) agar and modified cefoperazone, charcoal, deoxycholate (mCCD) agar for various strains of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter pullorion*.  
International Journal of Food Microbiology 38, 201 - 209.
- CORRY, J. E. L. AND H. I. ATABAY. (2001)  
Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms.  
Journal of Applied Microbiology 90, 96 - 114.
- BARTHOLOMÄ, A. AND NAUMANN, H. (2006)  
*Arcobacter* in Lebensmitteln.  
Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit  
Volume 1, Supplement 2 / Dezember 2006, 1661 – 5867.
- DE BOER, E., TILBURG, J. J., WOODWARD, D. L., LIOR, H. AND JOHNSON, W. M. (1996)  
A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats.  
Letters of Applied Microbiology 23, 64 - 66.
- DE OLIVERIA, S. J., BAETZ, A. L., WESLEY, I. V. AND HARMON, K. M. (1997)  
Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil.  
Veterinary Microbiology 57, 347 - 354.

- DONACHIE, S. P., BOWMAN, J. P. AND ALAM, M. (2004)  
Psychroflexus tropicus sp. nov., an obligately halophilic *Cytophaga Flavobacterium*-*Bacteroides* group bacterium isolated from an Hawaiian hypersaline lake.  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 935 - 940.
- DONACHIE, S. P., BOWMAN, J. P., ON, S. L. AND ALAM, M. (2005)  
*Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*.  
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66, 1271 - 1277.
- ELLIS, W. A., NEILL, S. D., O'BRIAN, J. J., FERGUSON, H. W. AND HANNA, J. (1977)  
Isolation of *spirillum/vibrio*-like organisms from bovine foetuses.  
Veterinary Record 100, 451 - 452.
- FERA, M. T., MAUGERI, T. L., GUGLIANDOLO, C., BENINATI, C., GIANNONE, M., LA CAMERA, E. AND CARBONE, I. (2004)  
Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea.  
Applied and Environmental Microbiology 70, 1271 - 1276.
- FERNÁNDEZ, H., ELLER, G., PAILLACAR, J., GAJARDO, T. AND RIQUELME, A. (1995)  
Toxigenic and invasive capacities: Possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*.  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 90, 633 - 634.
- FESTY, B., SQUINAZI, F., MARIN, M., DERIMAY, R. AND LIOR, H. (1993)  
Poultry meat and water as the possible sources of *Arcobacter butzleri* associated human disease in Paris, France.  
Acta Gastro-Enterologica Belgium (Suppl.), 35.
- GOLLA, S. C., MURANO, E. A., JOHNSON, L. G., TIPTON, N. C., CUREINGTON, E. A. AND SAVELL, J. W., (2002)  
Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods.  
Journal of Food Protection 65, 1849 - 1853.
- GONZÁLEZ, I., GARCIA, T., ANTOLIN, A., HERNANDEZ, P. E. AND MARTIN, R. (2000)  
Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat.  
Letters of Applied Microbiology 30, 207 - 212.
- GONZÁLEZ, A., BOTELLA, S., MONTES, R.M., MORENO, Y. AND FERRÚS, M.A. (2007)  
Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain.  
Journal of Food Protection 70, 341 - 347.
- HARMIR, A. N., SONN, R. J., FRANKLIN, S., WESLEY, I. V. (2004)  
*Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusception in a raccoon (*Procyon lotor*).  
The Veterinary Record 155, 338 - 340.

HARMON, K. M. AND WESLEY, I. V. (1996)

Identification of *Arcobacter* Isolates by PCR.  
Letters of Applied Microbiology 23, 241 – 244.

HARMON, K. AND WESLEY, I. (1997)

Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacters*.  
Veterinary Microbiology 58, 215 - 227.

HIGGINS, R., MESSIER, S., DAIGNAULT, D. AND LORANGE, M. (1999)

*Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate.  
Laboratory Animals 33, 87 - 90.

HILTON, C. L., MACKEY, B. M., HARGREAVES, A. J. AND FORSYTHE, S. J. (2001)

The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments.  
Journal of Applied Microbiology 91, 929 – 932.

HILDEBRANDT, G. (2004)

*Arcobacter* in der Hähnchenkeule. Veterinäre der Freien Universität Berlin entdecken neuen Krankheitskeim in "frischem" Fleisch.  
<http://vvvvvv.berlinews.de/archiv-2004/2384.shtml>

HO, H. T., LIPMAN, L. AND GAASTRA, W. (2006)

*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!  
Veterinary Microbiology 115, 1 – 13.

HO, H. T., LIPMAN, L. AND GAASTRA, W. (2008)

The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses.  
International Journal of Food Microbiology 125, 223 – 229.

HOUF, K., TUTENEL, A., DE ZUTTER, L., VAN HOOF, J. AND P. VANDAMME. (2000)

Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*.  
FEMS Microbiology Letters 193, 89–94.

HOUF, K., DEVRIESE, L. A., DE ZUTTER, L., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2001A)

Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media.  
Journal of Clinical Microbiology 39, 1654 – 1656.

HOUF, K., DEVRIESE, L., DE ZUTTER, L., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2001B)

Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products.  
International Journal of Food Microbiology 71, 189 - 196.

- HOUF, K., DE ZUTTER, L., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2002A)  
Assessment of the Genetic Diversity among *Arcobacters* Isolated from Poultry Products by Using Two PCR-Based Typing Methods.  
*Applied Environmental Microbiology* 68, 2172 – 2178.
- HOUF, K., DE ZUTTER, L., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2002B)  
Occurrence and distribution of *Arcobacter* species in poultry processing.  
*Journal of Food Protection* 65, 1233 - 1239.
- HOUF, K., DE ZUTTER, L., VERBEKE, B., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2003)  
Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse.  
*Journal of Food Protection* 66, 364 - 369.
- HOUF, K., ON, S. L., COENYE, T., MAST, J., VAN HOOF, J. AND VANDAMME, P. (2005)  
*Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses.  
*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 713 - 717.
- HOUF, K., AND STEPHAN, R. (2007)  
Isolation and characterization of the emerging food born pathogen *Arcobacter* from human stool.  
*Journal of Microbiological Methods* 68, 408–413.
- HSUEH, P., TENG, L., YANG, P., WANG, S., CHANG, S., HO, S., HSIEH, W. AND LUH, K. (1997)  
Bacteraemia caused by *Arcobacter cryaerophilus* I B.  
*Journal of Clinical Microbiology* 35, 489 - 491.
- HURTADO, A. AND OWEN, R. (1997)  
A molecular scheme based on 23S rRNA gene polymorphisms for rapid identification of *Campylobacter* and *Arcobacter* species.  
*Journal of Clinical Microbiology* 35, 2401 - 2404.
- JACOB, J., LIOR, H. AND FEUERPFEL, I. (1993)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in Eastern Germany.  
*Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 193, 557 - 562.
- JACOB, J., WOODWARD, D., FEUERPFEL, I., AND JOHNSON, W. M. (1998)  
Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany.  
*Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 201, 189 - 198.
- JOHNSON, L. G. AND MURANO, E. A. (1999)  
Development of a new medium for the Isolation of *Arcobacter* spp..  
*Journal of Food Protection* 62, 610 - 614.
- JOHNSON, L. G. AND MURANO, E. A. (2002)  
Lack of a cytolethal distending toxin amon *Arcobacter* Isolates from various sources.  
*Journal of Food Protection* 65, 1789 – 1795.

- KABEYA, H., KOBAYASHI, Y., MARUYAMA, S. AND MIKAMI T. (2003)  
One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species.  
International Journal of Food Microbiology 81, 163–168.
- KABEYA, H., MARUYAMA, S., MORITA, Y., OHSUGA, T., OZAWA, S., KOBAYASHI, Y., ABE, M., KATSUBE, Y. AND MIKAMI, T. (2004)  
Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan.  
International Journal of Food Microbiology 90, 303 - 308.
- KIEHLBAUCH, J. A., BRENNER, D., NICHOLSON, M., BAKER, C., PATTON, C., STEIGERWALT, A. AND WÄCHSMUTH, I. (1991A)  
*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrhoeal illness.  
Journal of Clinical Microbiology 29, 376 - 385.
- KIEHLBAUCH, J. A., PLIKAYTIS, B. D., SWAMINATHAN, B., CAMERON, D. N. AND WACHSMUTH, I. K. (1991B)  
Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *campylobacter* species.  
Journal of Clinical Microbiology 33, 1670 - 1676.
- KIEHLBAUCH, J. A., BAKER, C. N. AND WACHSMUTH, I. K. (1992)  
In vitro susceptibilities of aerotolerant *Campylobacter* isolates to 22 antimicrobial agents.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 36, 717 – 722.
- LAMMERDING, A. M., HARRIS, J. E., LIOR, E.I., WOODWARD, D. E., COLE, L. AND MUCKLE, C. A. (1996)  
Isolation method for the recovery of *Arcobacter butzleri* from fresh poultry and poultry products.  
In D. Newall, J. Ketley, *Campylobacter* VII (pp. 329 - 333). New York: Plenum Press.
- LAU, S. K., WOO, P. C., TENG, J. L., LEUNG, K. W. AND YUEN, K. Y. (2002)  
Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis.  
Journal of Clinical Pathology 55, 182–185.
- LEHNER, A., TASARA, T. AND STEPHAN, R. (2005)  
Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential food borne pathogen.  
International Journal of Food Microbiology 102, 127 - 135.
- LERNER, J., BRUMBERGER, V. AND PREAC-MURSIC, V. (1994)  
Severe diarrhoea associated with *Arcobacter butzleri*.  
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13, 660 - 662.
- LIPMAN, L., HO, H. AND GAASTRA, W. (2008)  
The presence of *Arcobacter* species in breeding hens and eggs from these hens.  
Poultry Science 87, 2404 – 2407.

- LOGAN, E. F., NEIL, S. D. AND MACKIE, D. P. (1982)  
Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*.  
The Veterinary Record 110, 229 - 230.
- MANKE, T., WESLEY, I., DICKSON, J. AND HARMON, K. (1998)  
Prevalence and genetic variability of *Arcobacter* species in mechanically separated turkey.  
Journal of Food Protection 12, 1623 - 1628.
- MANSFIELD, L. P. AND FORSYTHE, S. L. (2000)  
*Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* — potential emerging human pathogens.  
Reviews in Medical Microbiology 111, 161 - 170.
- MARINESCU, M., COLLIGNON, A., SQUINAZI, F., WOODWARD D., AND LIOR, H. (1996)  
Biotypes and serogroups of poultry strains of *Arcobacter* spp. isolated in France.  
Plenum press New York, 519 – 520.
- MARSHALL, S. M., MELITO, P. L., WOODWARD, D. L., JOHNSON, W. M., RODGERS, F. G. AND MULVEY, M. R. (1999)  
Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCRrestrictionlength fragment polymorphism analysis of the 16s rRNA gene.  
Journal of Clinical Microbiology 37, 4158 – 4160.
- MAC, K., MELCHNER, T., PETERS, J., TOUTOUNIAN, K. AND ELLERBROEK, L. (2006)  
*Arcobacter* spp. along the food chain: Effects of meat processing parameters on the traceability and survival potential.  
Amtstierärztlicher Dienst Sonderausgabe 26. - 29.9.2006 (ISSN 0945 - 3296), 244.
- MAUGERI, T. L., GUGLIANDOLO, C., CARBONE, M., CACCAMO, D. AND FERA, M. T. (2000)  
Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment.  
Microbiologica 23, 143 – 149.
- MAXWELL, A. (1997)  
DNA gyrase as a drug target.  
Trends Microbiology 5, 102 – 109.
- McCLUNG, C. R., PATRIQUIN, D. G. AND DAVIS, R. E. (1983)  
*Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora*.  
International Journal of Systematic Bacteriology 33, 605 - 612.
- MORENO, Y., BOTELLA, S., ALONSO, J. L., FERRÚS, M. A., HERNÁNDEZ, M. AND HERNÁNDEZ, J. (2003)  
Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* Strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization.  
Applied and Environmental Microbiology 69, 1181 – 1186.

MORITA, Y., MARUYAMA, S., KABEYA, H., BOONMAR, S., NIMSUPHAN, B., NAGAI, A., KOZAWA, K., NAKAJIMA, MIKAMI, T. AND KIMURA, H. (2004)

Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand.  
Microbiology and Immunology 48, 527 – 533.

MUSMANNO, R. A., RUSSI, M., LIOR, H. AND FIGURA, N. (1997)

In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples.  
Microbiologica 20, 63 - 68.

NEILL, S. D., CAMBELL, J. N., O'BRIEN, J. J., WEATHERUP, S. T. C. AND ELLIS, W.A. (1985)

The taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. novo.  
International Journal of Systematic Bacteriology 35, 342 – 35.

ÖNGÖR, H., CETINKAYA, B., ACIK, M. N. AND ATABAY, H. I. (2004)

Investigation of *Arcobacter* in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey.  
Letters of Applied Microbiology 38, 339 - 344.

OHLENDORF, D. S. AND MURANO, E. A. (2002)

Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods.  
Journal of Food Protection 65, 1700 - 1705.

ON, S. L., STACEY, A. AND SMYTH, J. (1995)

Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia.  
Journal of Infectious diseases 31, 225 – 227.

ON, S. L. W. (1996)

Identification methods for *campylobacters*, *helicobacters*, and related organisms.  
Clinical Microbiology Review 9, 405 - 422.

ON, S. L. W., JENSEN, T. K., BILLE-HANSEN, V., JORSAL, S. E. AND VANDAMME, P. (2002)

Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark.  
Veterinary Microbiology 85, 159 – 167.

PEJCHALOVÁ, M., DOSTALÍKOVÁ, E., SLÁMOVÁ, M., BROZKOVÁ, I. AND VYTRASOVÁ, J. (2008)

Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic.  
Journal of Food Protection 71, 719 – 727.

PESCE, E., SQUINAZI, F., MARIN, M., DERIMAY, R. AND LIOR, H. (1993)

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



- PETERS, J., MELCHNER, T., MAC, K. N., TOUTOUNIAN, K., REETZ, J., ALTER, T. AND ELLERBROEK, L. (2006)  
Vorkommen von *Arcobacter* spp. in Hähnchen- und Schweinefleisch aus dem Einzelhandel.  
Amtstierärztlicher Dienst Sonderausgabe 26.-29.9.2006 (ISSN 0945-3296), 264.
- 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 *A. butzleri*.  
Letters in Applied Microbiology 29, 424 - 428.
- PHILLIPS, C. A. (2001A)  
*Arcobacter* spp in food: isolation, identification and control.  
Trends Food Science Technology 12, 263 - 275.
- PHILLIPS, C. A. (2001B)  
*Arcobacters* as emerging human food borne pathogens.  
Food Control 12, 1 - 6.
- PROUZET-MAULÉON, V., LABADI, L., BOUGES, N., MÉNARD, A., AND MÉGRAUD, F. (2006)  
*Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen.  
Emergency Infectious Diseases 12, 307 - 309.
- RICE, E. W., RODGERS, M. R., WESLEY, I. V., JOHNSON, C. H., AND TANNER, S. A. (1999)  
Isolation of *A. butzleri* from ground water.  
Letters in Applied Microbiology 28, 31 - 35.
- RIDSDALE, J. A., ATABAY, H. I., AND CORRY, J. E. L. (1998)  
Prevalence of *campylobacters* and *arcobacters* in ducks at the abattoir.  
Journal of Applied Microbiology 85, 567 - 573.
- RIVAS, L., FEGAN, N. AND VANDERLINDE, P. (2004)  
Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat.  
International Journal of Food Microbiology 91, 31 - 41.
- ROHDER, A., KLEER, J. AND HILDEBRANDT, G. (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 Lebensmittelhygiene 58 (5), 188 - 191
- ROMERO, J., GARCÍA-VARELA, M., LACLETTE, J. P. AND ESPEJO, R. T. (2002)  
Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*).  
Microbial Ecology 44, 365 - 371.

SCHEU, P. M., BERGHOF, K. AND STAHL, U. 1998.

Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction.  
Food Microbiology 15, 13 - 31.

SCULLION, R, HARRINGTON, C. S. AND MADDEN, R. H. (2004)

A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry meat in Northern Ireland.  
Journal of Food Protection 67, 799 - 804.

SCULLION, R., HARRINGTON, C. S. AND MADDEN, R. H. (2006)

Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland.  
Journal of Food Protection 69, 1986 – 1990.

SHROEDER-TUCKER, L., WESLEY, I. V., KIEHLBAUCH, J. A., LARSON, D. J., THOMAS, L. A. AND ERICKSON, G. A. (1996)

Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses.  
Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation 8, 186 - 195.

SKIRROW, M. B. (1994)

Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related Bacteria.  
Journal of comparative pathology 111, 113 - 149.

SON, I., ENGLER, M.D., BERRANG, M.E., FEDORKA-CRAY, P.J. AND HARRISON, M.A. (2007A)

Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses.  
International Journal of Antimicrobial Agents 29, 451 - 455.

SON, I., ENGLER, M.D., BERRANG, M.E., FEDORKA-CRAY, P.J. AND HARRISON, M.A. (2007B)

Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing.  
International Journal of Food Microbiology 113, 16 – 22.

STAMPI, S., DELUCA, G., VAROLI, O. AND ZANETTI, F. (1999)

Occurrence removal and seasonal variation of thermophilic *campylobacters* and *arcobacter* in sewage sludge.  
Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin 202, 19 - 27.

SUAREZ, D., WESLEY, I. AND LARSON, D. (1997)

Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine.  
Veterinary Microbiology 4, 325 - 336.

TAYLOR, D. N., KIEHLBAUCH, J. A., TEE, W., PITARANGSI, C. AND ECHEVERRIA, P. (1991)

Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhoea.  
Journal of infectious Diseases 163, 1062 - 1067.

- TEE, W., BAIRD, M., DYALL-SMITH, M. AND DWYER, B. (1988)  
*Campylobacter cryaerophilus* isolated from a human.  
Journal of Clinical Microbiology 26, 2469 - 2473.
- VANDAMME, P., FALSEN, E., ROSSAU, R., HOSTE, B., SEGERS, P., TYTGAT, R. AND DE LEY, J. (1991)  
Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen.  
International Journal of Systematic Bacteriology 41, 88 - 103.
- VANDAMME, P., PUGINA, P., BENZI, G., VAN ETTERIJCK, R., VLAES, L., KESTERS, K., BUTZLER, J.P., LIOR, H. AND LAUWERS, S. (1992A)  
Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school.  
Journal of Clinical Microbiology 30, 2335 - 2337.
- VANDAMME, P., VANCANNEYT, M., POT, B., MELS, L., HOSTE, B., DEWETTINCK, D., VLAES, L., VAN DEN BORRE, C., HIGGENS, R., HOMMEZ, J., KESTERS, K., BUTZLER, J. P. AND GOOSSENS, H. (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.  
International Journal of Systematic Bacteriology 41, 344 - 356.
- VANDENBERG, O., DEDISTE, A., HOUF, K., IBEKWEM, S., SOUAYAH, H., CADRANEL, S., DOUAT, N., ZISSIS, G., BUTZLER J. P. AND VANDAMME, P. (2004)  
*Arcobacter* species in humans.  
Emerging Infectious Diseases 10, 1863 – 1867.
- VANDENBERG, O., HOUF, K., DOUAT, N., VLAES, L., RETORE, P., BUTZLER, J.-P. AND DEDISTE, A. (2006)  
Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and *arcobacters* from Belgium.  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57, 908 – 913.
- VAN DRIESSCHE, E., HOUF, K., VAN HOOF, J., DE ZUTTER, L. AND VANDAMME, P. (2003)  
Isolation of *Arcobacter* species from animal faeces.  
FEMS Microbiology Letters 229, 243 - 248.
- VAN DRIESSCHE, E., HOUF, K., VANGROENWEGHE, F., DE ZUTTER, L. AND VAN HOOF, J. (2005)  
Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium.  
Veterinary Microbiology 105, 149 – 54.
- VILLARRUEZ-LOPEZ, A., MARQUEZ-GONZALES, M., GARAY-MARTINEZ, L. E., ZEPEDA, H., CASTILLO, A., MOTA DE LA GARZA, L., MURANO, E. A. AND TORRES-VITELA, R. (2003)  
Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero cells.  
Journal of Food Protection 66, 1374 – 1378.

VINDIGNI, S. M., SRIJAN, A., WONGSTITWILAIRROONG, B., MARCUS, R., MEEK, J., RILEY, P. AND MASON, C. (2007)

Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand.  
Journal of foodborne pathogen and disease 4, 208 – 215.

WESLEY, I. V., SCHROEDER-TUCKER, L., BAETZ, A., DEWHIRST, F. E. AND PASTER, B. J. (1995)

*Arcobacter*-specific and *Arcobacter butzleri*-specific 16S rRNA-based DNA probes.  
Clinical Microbiology 33, 1691 - 1698.

WESLEY, I. V. (1996A)

*Helicobacter* and *Arcobacter* Species: risks for foods and beverages.  
Journal of Food Protection 59, 1127 - 1132.

WESLEY, I., BAETZ, A. AND LARSON, D. (1996B)

Infection of caesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*,  
*Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter Skirrowii*.  
Infectious Immunology 64, 2295 - 2299.

WESLEY, I. (1997)

*Helicobacter* and *Arcobacter*: potential human food borne pathogens?  
Trends Food Science Technology 8, 293 - 299.

WESLEY, I. V., AND BAETZ, A. L. (1999)

Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry.  
Poultry Science 78, 536 – 545.

WESLEY, I., WELLS, S. J., HARMON, K. M., GREEN, A., SCHROEDER-TUCKER, L., GLOVER, M. AND SIDDIQUE, I. (2000)

Faecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle.  
Applied and Environmental Microbiology 66, 1994 - 2000.

WINTERS, D. K. AND SLAVIK, M. F. (2000)

Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products.  
Molecular and Cellular Probes 14, 95 – 99.

WIRSEN, C. O, SIEVERT, S. M, CAVANAUGH, C. M, MOLYNEAUX, S. J, AHMAD, A., TAYLOR, L., DELONG, E. F. AND TAYLOR, C. D. (2002)

Characterization of an autotrophic sulphide-oxidizing marine *Arcobacter* spp. that produces filamentous sulphur.  
Applied and Environmental Microbiology 68, 316 - 325.

WYBO, I., BREYNAERT, J., LINDENBURG, F., HOUF, K. AND LAUWERS, S. (2004)

Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhoea.  
Journal of Clinical Microbiology 42, 1851 - 1852.

YAN, J. J., WANG, W. C., HUANG, A. H., CHEN, H. M., JIN, Y. T. AND WU, J. J. (2000)

*Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with liver cirrhosis.  
Journal of the Formosan Medical Association 99, 166 - 169.

ZANETTI, F., VAROLI, O., STAMPI, S. AND DE LUCA, G. (1996)

Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin.  
International Journal of Food Microbiology 33, 315 - 321.

## H Sonstiges

### 1 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ZUR VERBREITUNG VON ARCOBACTER SPP. IN ROHEM FLEISCH.....	19
TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER VERSCHIEDENE KULTURELLE VERFAHREN ZUM ARCOBACTER-NACHWEIS.....	22
TABELLE 3: HEMMSTOFFE VON ANREICHERUNGSBOUILLONS UND BEBRÜTUNGSBEDINGUNGEN VON ARCOBACTER.....	23
TABELLE 4: HEMMSTOFFE VON SELEKTIVNÄHRBÖDEN UND BEBRÜTUNGSBEDINGUNGEN VON ARCOBACTER.....	24
TABELLE 5: PHÄNOTYPISCHE DIFFERENZIERUNG VON A. BUTZLERI, A. CRYAEROPHILUS UND A. SKIRROWII (ON ET AL., 1996; ATABAY ET AL., 1997).....	26
TABELLE 6: VERWENDETE STAMMKULTUREN.....	29
TABELLE 7: ANZAHL DER UNTERSUCHTEN GEFLÜGEL UND GEFLÜGELFLEISCHERZEUGNISSEN.....	30
TABELLE 8: VERSUCHSANSÄTZE UND ANZUCHTBEDINGUNGEN DER ANREICHERUNGSBOUILLONS.....	33
TABELLE 9: VERSUCHSANSÄTZE DER NÄHRBÖDEN.....	34
TABELLE 10: PRIMER FÜR PCR NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	38
TABELLE 11: REAKTIONSMIX FÜR PCR NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	39
TABELLE 12: PRIMER FÜR M-PCR NACH HOUF ET AL. (2000).....	41
TABELLE 13: REAKTIONSMIX FÜR M-PCR NACH HOUF ET AL. (2000).....	42
TABELLE 14: MODIFIKATIONEN DER ANREICHERUNGSBOUILLONS UND BEBRÜTUNGSBEDINGUNGEN.....	43
TABELLE 15: MODIFIKATIONEN DER SELEKTIVEN NÄHRBÖDEN UND BEBRÜTUNGSBEDINGUNGEN.....	44
TABELLE 16: KULTURELLER NACHWEIS VON ARCOBACTER.....	45
TABELLE 17: BESTÄTIGUNG VERDÄCHTIGER KULTURELLER PROBEN AUS NICHT VERZEHRFERTIGEN GEFLÜGELPRODUKTEN MIT M-PCR NACH HOUF ET AL. (2000).....	46
TABELLE 18: NACHWEIS VON ARCOBACTER IN DEN UNTERSUCHTEN PROBEN MITTELS PCR.....	47
TABELLE 19: NACHWEIS VON ARCOBACTER SPP. IN DEN GEFLÜGELPROBEN MITTELS PCR.....	48
TABELLE 20: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE DE BOER ET AL. (1996).....	78
TABELLE 21: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE HOUF ET AL. (2001).....	78
TABELLE 22: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE JOHNSON-MURANO (1999).....	79
TABELLE 23: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE GONZÁLEZ ET AL. (2000) (MIKROAEROB).....	79
TABELLE 24: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE GONZÁLEZ ET AL. (2000) (MIKROAEROB UND AEROB).....	80
TABELLE 25: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE DE BOER ET AL. (1996).....	80
TABELLE 26: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE HOUF ET AL. (2001).....	81

TABELLE 27: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE GONZÁLEZ ET AL. (2000) (MIKROAEROB).....	81
TABELLE 28: VERÄNDERTE ANTIMIKROBIELLE ZUSÄTZE METHODE GONZÁLEZ ET AL. (2000) (MIKROAEROB UND AEROB).....	82
TABELLE 29: ERGEBNISSE DNA-AUFARBEITUNG NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	82
TABELLE 30: ERGEBNISSE DNA-AUFARBEITUNG NACH PREPMANTM (2002).....	83
TABELLE 31: DETAILÜBERSICHT DER UNTERSUCHTEN GEFLÜGELPROBEN.....	84

## 2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: WACHSTUM VON A. BUTZLERI AUF EINEM MODIFIZIERTEN NÄHRBODEN NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	9
ABBILDUNG 2: GEGENÜBERSTELLUNG DER NACHWEISMETHODEN VON ARCOBACTER.....	49
ABBILDUNG 3: NACHWEIS VON ARCOBACTER MIT KULTURELLEN METHODEN.....	75
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ARBEITSABLAUFS DER PCR NACH GONZÁLEZ ET AL. (2000).....	76
ABBILDUNG 5: PROBENAUFARBEITUNG NACH DER PREPMANTM ULTRA METHODE.....	77

### **3 Danksagung**

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Stolle für die Überlassung des Themas und bei Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa und Frau Dr. Silke Wacheck für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt auch Julia Blümel, ihrer Familie und Sarah Reddeck die mir bei Problemen zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes in Karlsruhe für die Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor und für ihr Entgegenkommen bei Problemen.



## 4 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

NAME STINY  
VORNAME SASCHA  
GEBURTSDATUM 1.3.1978  
GEBURTSORT KANDEL  
WOHNHAFT HAUPTSTRASSE 10, 76889 SCHWEIGHOFEN

---

### SCHULBILDUNG

1984 - 1988 GRUNDSCHULE WÖRTH AM RHEIN  
1988 - 1989 STAATLICHES GYMNASIUM WÖRTH AM RHEIN  
1989 - 1997 STAATLICHES GYMNASIUM BAD BERGZABERN  
ABSCHLUSS: ABITUR

---

### MILITÄRAUSBILDUNG

1997 - 1999 FEUERLEITSOLDAT BEIM 4./PANZERARTILLERIELEHRBATAILLON 345 IN KUSEL

---

### STUDIUM

1999 - 2004 STUDIUM DER VETERINÄRMEDIZIN AN DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT IN GIESSEN  
JULI 2004 APPROBATION

---

### BERUFSTÄTIGKEIT

1.8.2004 - 4.4.2005 ANGESTELLT ALS LABORLEITER AM CHEMISCHEN UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSAMT  
KARLSRUHE ABTEILUNG VI  
4.4.2005 - 31.12.2007 DOKTORAND AM CHEMISCHEN UND VETERINÄRUNTERSUCHUNGSAMT KARLSRUHE  
ABTEILUNG VI  
SEIT 1.8. 2004 ANGESTELLT ALS AMTLICHER TIERARZT BEI DER KREISVERWALTUNG SÜDLICHE  
WEINSTRASSE IN LANDAU/ PFALZ  
SEIT 1.10. 2004 ERÖFFNUNG EINER TIERÄRZTLICHEN PRAXIS FÜR GROSS- UND KLEINTIERE IN  
SCHWEIGHOFEN/ PFALZ

---