

**Aus dem Institut für  
Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians – Universität München**

**Lehrstuhl Univ.- Prof. Dr. A. Stolle**

**Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt  
- Diagnostikzentrum -  
Aulendorf  
Ltd. VD Dr. H. Stöppler**

**Entwicklung und Anwendung eines  
Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)  
für die Erfassung der  
Campylobacter-Situation in Schweinebeständen  
mittels Blutserum- und Fleischsaftproben**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians – Universität München

von  
Alexandra Kley  
aus  
Wangen

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Die vorliegende Arbeit wurde aus dem Projekt: „Verminderung des Eintrags von bestimmten Zoonosenerregern über Schweinefleisch in die Nahrungskette unter besonderer Berücksichtigung von Salmonellen- und Campylobacter- Spezies“ aus Mitteln der Landesstiftung Baden Württemberg gemeinnützige GmbH teilweise unterstützt.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>2</b>
<b>II.1</b>	<b>Charakteristika der Gattung Campylobacter</b>	<b>2</b>
II.1.1	Taxonomische Einordnung und charakteristische Eigenschaften der Gattung Campylobacter	2
II.1.2	Pathogenität von Campylobacter	5
II.1.3	Campylobacter-Infektionen beim Menschen	7
II.1.3.1	Pathogenese und Klinik beim Menschen	8
II.1.3.2	Immunantwort bei einer Campylobacter-Infektion des Menschen	9
II.1.4	Immunantwort bei einer Campylobacter-Infektion bei Tieren	11
II.1.5	Antigene Strukturen	13
II.1.6	Vorkommen von Campylobacter bei Schweinen	17
II.1.7	Vorkommen von Campylobacter bei anderen Tierarten	26
<b>II.2</b>	<b>Möglichkeiten der Campylobacterdiagnostik</b>	<b>28</b>
II.2.1	Kulturelle Nachweismethoden	28
II.2.2	Biochemische Differenzierung	30
II.2.3	Moderne Antigen-Nachweismethoden	31
II.2.4	Methoden des Antikörpernachweises	32
II.2.4.1	Campylobacter-Antikörper-Diagnostik in der Humanmedizin	32
II.2.4.2	Campylobacter-Antikörper-Diagnostik in der Tiermedizin	33
<b>II.3</b>	<b>Derzeitige rechtliche Handhabung</b>	<b>35</b>
II.3.1	Humanmedizinische Vorschriften	35
II.3.2	Tiermedizinische Vorschriften in Europa	35
II.3.3	Vorschläge für Rechtsakte	36
II.3.4	Fleischhygienerechtliche Vorschriften	37
II.3.5	Lebensmittelrechtliche Vorschriften	37

<b>III.</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>38</b>
<b>III.1</b>	<b>Material und Geräte</b>	<b>38</b>
III.1.1	Impfschweine	38
III.1.2	Kulturmedien für die Anzucht von Campylobacter	38
III.1.2.1	Halbfestes Nährmedium	38
III.1.2.2	Feste Nährmedien	39
III.1.3	Biologische Materialien	42
III.1.4	Material und Geräte für die Anzucht und Identifizierung von Campylobacter	43
III.1.5	Material und Geräte für die Antigenherstellung	44
III.1.6	Reagenzien und Laborbedarf für die Impfstoffherstellung, Immunisierung und Probengewinnung	45
III.1.7	Material und Geräte zur Proteinbestimmung der Antigensuspension	45
III.1.8	Material und Geräte für die Entwicklung und Durchführung des ELISA' s	46
III.1.8.1	Geräte	46
III.1.8.2	Gebrauchsmaterialien	47
III.1.8.3	Reagenzien für ELISA	48
III.1.9	Herstellung der Gebrauchslösungen für den ELISA	49
<b>III.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>51</b>
III.2.1	Indirekter ELISA	51
III.2.2	Für die Antigenherstellung verwendete Campylobacterstämme	53
III.2.2.1	Mikrobankmethode	53
III.2.2.2	Anzucht der Bakterien	54
III.2.2.3	Identifizierung von thermophilen Campylobacter-Stämmen	56
III.2.3	Antigenherstellung	57
III.2.3.1	Gewinnung der Kolonien	57
III.2.3.2	Antigen-Fragmentierung	58
III.2.3.3	Präparation von Campylobacter-Flagellin	58
III.2.4	Proteinbestimmung	58
III.2.4.1	Proteinbestimmung nach LOWRY	58
III.2.4.2	Proteinbestimmung mit Merckotest® (Biuret)	59
III.2.4.3	Photometrische Proteinbestimmung (ohne Farbreaktion)	60

III.2.5	Antigenbeschichtung	60
III.2.5.1	Auswahl der Mikrotiterplatten	60
III.2.5.2	Auswahl des Beschichtungspuffers	61
III.2.5.3	Antigenkonzentration für die Beschichtung	61
III.2.5.4	Unterschiedliche Beschichtungsbedingungen	63
III.2.6	Durchführung des ELISA	63
III.2.6.1	Auswahl der Waschlösung und des Blockpuffers	63
III.2.6.2	Waschvorgang der Mikrotiterplatten	64
III.2.6.3	Verdünnung der Proben	64
III.2.6.4	Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Schwein Konjugates	65
III.2.7	Produktion von porcinen Antikörpern (als positive Kontrolle)	66
III.2.7.1	Impfschweine	66
III.2.7.2	Mikrobiologische Untersuchung von Sammelkotproben und Seren der Versuchsschweine	66
III.2.7.3	Herstellung der Vakzine	67
III.2.7.4	Durchführung der Immunisierung und Blutprobenentnahme mit Serumgewinnung	68
III.2.7.5	Gewinnung von Serum und Fleischsaft bei der Schlachtung	69
III.2.8	Bestimmung der Campylobacter-Antikörper in den Hyperimmunsereen und in den Fleischsaftproben der Impfschweine	69
III.2.9	Homogenität der beschichteten Mikrotiterplatten	70
III.2.10	Präadsorption der Versuchsschweine-Schlachtseren mit homologem Antigen bzw. mit E. coli	71
III.2.11	Überprüfung von Kreuzreaktivitäten mit anderen Campylobacter-Stämmen	73
III.2.12	Exemplarische Anwendung des ELISA	73
III.2.12.1	Bestimmung von Campylobacter-Antikörpern in Feldserumproben	73
III.2.12.2	Bestimmung von Campylobacter-Antikörpern in Feldfleischsaftproben	74

<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>76</b>
<b>IV.1</b>	<b>Entwicklung des ELISA</b>	<b>76</b>
IV.1.1	Verwendung unterschiedlicher Campylobacter-Stämme als Antigen	76
IV.1.1.1	Thermophile Campylobacter-Stämme für die Antigenbeschichtung	76
IV.1.1.2	Identifizierung der Campylobacter-Stämme	76
IV.1.2	Antigengewinnung	77
IV.1.2.1	Anzucht der Bakterien	77
IV.1.2.2	Gewinnung der Kolonien	78
IV.1.2.3	Waschvorgang	78
IV.1.3	Antigenfragmentierung	79
IV.1.3.1	Beschallung	79
IV.1.3.2	Präparation von Campylobacter-Flagellin	80
IV.1.4	Proteinbestimmung	81
IV.1.5	Antigenbeschichtung	82
IV.1.5.1	Auswahl der Mikrotiterplatten	82
IV.1.5.2	Antigenkonzentration für die Beschichtung	82
IV.1.5.3	Auswahl des Beschichtungspuffers	82
IV.1.5.4	Unterschiedliche Beschichtungsbedingungen	83
IV.1.6	Auswahl der Waschlösung und des Block- und Verdünnungspuffers	84
IV.1.7	Verdünnung der Proben	84
IV.1.8	Verwendung des Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-SchweinKonjugates	85
<b>IV.2</b>	<b>ELISA- Ablauf</b>	<b>85</b>
<b>IV.3</b>	<b>Plattenhomogenität</b>	<b>89</b>
<b>IV.4</b>	<b>Verwendung von weiteren Campylobacter Stämmen zur Überprüfung von Kreuzreaktivitäten der Hyperimmun- und Feldseren</b>	<b>90</b>
<b>IV.5</b>	<b>Ergebnisse der Immunisierung</b>	<b>93</b>
IV.5.1	Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen der Impfschweine	93
IV.5.2	Serologische Untersuchungsergebnisse der Serum- und Fleischsaftproben der immunisierten Schweine (Impfschweine)	93
IV.5.2.1	Serumergebnisse der Impfschweine	93

IV.5.2.2	Fleischsaftergebnisse der Impfschweine	99
<b>IV.6</b>	<b>Präadsorption der Impfschweine-Schlachtseren mit dem homologen Antigen und mit Escherichia coli</b>	<b>103</b>
<b>IV.7</b>	<b>Serologische Untersuchungsergebnisse der Feldserumproben</b>	<b>107</b>
IV.7.1	Vergleichender Einsatz von zwei Fleischsaftverdünnungen auf verschiedenen Beschichtungsplatten	107
IV.7.2	Bestimmung der Campylobacter-OD-Werte in Seren von Muttersauen und Ferkeln	111
IV.7.3	Vergleichende Darstellung von Campylobacter OD-Werten und Salmonellen- Antikörper Ergebnissen	112
<b>IV.8</b>	<b>Serologische Untersuchung von Fleischsaftproben</b>	<b>115</b>
IV.8.1	Vergleichender Einsatz von zwei Fleischsaftverdünnungen auf verschiedenen Beschichtungsplatten	118
IV.8.2	Vergleichende Darstellung von Campylobacter-OD-Werten und Salmonellen- Antikörper Ergebnissen in Fleischsaft	120
IV.8.3	Ergebnisse der Untersuchung auf Campylobacter-Antikörper von mehreren Fleischsaft-Einsendungen einzelner Schweinebestände	121
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>127</b>
<b>V.1</b>	<b>Methodik</b>	<b>127</b>
<b>V.2</b>	<b>Serologische Untersuchungsergebnisse von Feldproben und Proben der immunisierten Impfschweine</b>	<b>130</b>
<b>V.3</b>	<b>Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter beim Schwein</b>	<b>133</b>
<b>V.4</b>	<b>Antikörper-Antwort auf eine Campylobacter-Infektion</b>	<b>136</b>
<b>V.5</b>	<b>Mögliche Bereiche für den Einsatz des entwickelten Testsystems und Ausblick</b>	<b>136</b>

<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>139</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>142</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>145</b>
<b>VIII.1</b>	<b>Untersuchungsergebnisse der Serumproben der sechs zur Antikörpergewinnung vakzinierten Schweine</b>	<b>145</b>
<b>VIII.2</b>	<b>Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse von Serumproben der Impfschweine zu unterschiedlichen Immunisierungszeitpunkten</b>	<b>154</b>
<b>VIII.3</b>	<b>Untersuchungsergebnisse der Fleischsaftproben der sechs zur Antikörpergewinnung vakzinierten Impfschweine</b>	<b>161</b>
<b>VIII.4</b>	<b>Ergebnisse der Präadsorption der Hyperimmunseren mit homologem und E.coli Antigen</b>	<b>164</b>
<b>VIII.5</b>	<b>Untersuchungsergebnisse von Feldproben aus unterschiedlichen Einsendungen</b>	<b>170</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>194</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Ak.	Antikörper
AVID	Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bzw.	beziehungsweise
CBA	Columbia-Butzler-Agar
CCDA	Cefoperazon-Charcoal-Deoxycholat-Agar
C.	Campylobacter
C.c.	Campylobacter coli
C.jej.	Campylobacter jejuni
CCUG	Culture Collection University of Göteborg (Schweden)
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Col A	Columbia A
Col B	Columbia B
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E.coli	Escherichia coli
et al.	et alii = und andere
FIHV	Fleischhygieneverordnung
FS	Fleischsaftinsendung
FUV	Fleischuntersuchungsverordnung (Schweiz)
g	Gramm
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
h	Stunde
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ISO	International Organization for Standardization
KbE	Kolonie bildende Einheit
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LKV	Landeskontrollverband
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MMP	Magermilch-Puffer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mm	Millimeter
MOMP	Major Outer Membrane Protein
N	Normal
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMP	Outer Membrane Protein
PAL	Peptidoglycan-assoziierte Lipoproteine
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PRRS	Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RKI	Robert Koch Institut
SE	Serumeinsendung
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
STUA	Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TMB	Tetramethylbenzidin
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
$\mu\text{g}$	Mikrogramm, $10^{-6}$ Gramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter, $10^{-6}$ Liter
$\mu\text{m}$	Mikrometer, $10^{-6}$ Meter
%	Prozent

## I. EINLEITUNG

In Deutschland rangieren *Campylobacter* als Ursache humaner bakterieller Darmerkrankungen hinter den Salmonellen an zweiter Stelle (RKI,1999). *Campylobacter* werden in verschiedenen europäischen Ländern und in den USA bereits öfter als Salmonellen als Verursacher bakteriell bedingter Gastroenteritiden des Menschen nachgewiesen (GLÜNDER und WEBER, 2000). Hierbei sind besonders *C. jejuni* und *C. coli* von Bedeutung. Im Jahre 2001 wurde in Deutschland eine durchschnittliche Häufigkeit von 66,2 *Campylobacter*-Fällen pro 100 000 Einwohner verzeichnet (RKI, 2002). Infektionen des Menschen erfolgen meist durch den Eintrag der Erreger in Lebensmittel und Trinkwasser, sowie durch Kontakt zu infizierten Tieren (KRAUSS et al., 1997). Als Hauptinfektionsquelle für humane *Campylobacter*-Infektionen wird Geflügelfleisch angesehen (RKI, 2001). Die größte Bedeutung als latenter Träger und Ausscheider von *Campylobacter* wird unter den landwirtschaftlichen Nutztieren dem Schwein zugemessen (WEBER, 1985; KRAUSS et al., 1997). Während *Campylobacter jejuni* vor allem durch Geflügel, aber auch durch Rinder in die Nahrungskette gelangen kann, konnte in einer dänischen Untersuchung *Campylobacter coli* im Darm von 43% der Schlachtschweine nachgewiesen werden (NIELSEN et al., 1997). Darüber hinaus fanden MOORE und MADDEN (1998) in 6% der Schweinelebern *Campylobacter* ssp., wobei *Campylobacter coli* mit 67% dominierte.

Das Auftreten von *Campylobacter*infektionen in Schweineherden soll an der Seroprävalenz, d.h. dem Vorkommen von Antikörpern gegen *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* (analog der Prüfung auf Salmonellen-Antikörper) untersucht werden. Im Gegensatz zur serologischen Salmonellenantikörper-Bestimmung in Schweineseren ist kein kommerzieller ELISA zur Bestimmung von *Campylobacter*-Antikörpern beim Schwein auf dem Markt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von *Campylobacter*-Antikörpern in Serum und Fleischsaft. Da hierfür auch keine definierten porcinen Antiseren zur Verfügung standen, mussten diese durch Immunisierung von Schweinen mit einer selbst hergestellten *Campylobacter*-Vakzine gewonnen werden.

## **II. LITERATUR**

### **II.1 Charakteristika der Gattung Campylobacter**

#### **II.1.1 Taxonomische Einordnung und charakteristische Eigenschaften der Gattung Campylobacter**

Schon im Jahre 1881 beschrieb ESCHERICH spiralförmige Darmbakterien bei an Durchfall erkrankten Kindern. MC FADYEAN und STOCKMAN beschrieben 1913 Erreger, die aus Mutterschafen und auch aus abortierten Foeten isoliert werden konnten und bezeichneten diese als Vibrionen. Als „Vibrio fetus“ bezeichneten dann im Jahre 1919 SMITH und TAYLOR die aus Abortmaterial von Rindern isolierten Keime. SMITH und ORCUTT (1927), sowie JONES et al. (1931) gelang die Isolierung von mikroaerophilen Vibrionen bei an Durchfall erkrankten Kälbern, welche von ihnen „Vibrio fetus“ genannt wurden.

In Jahre 1944 bezeichnete DOYLE „Vibrio coli“ als Erreger der Schweinedysenterie.

In vier verschiedene Bakterienvarianten teilte KING „Vibrio fetus“ im Jahre 1957 aufgrund ihrer unterschiedlichen Temperaturoptima ein. Die, die ihr Wachstumsoptimum bei 25°C hatten, wurden als „Vibrio fetus“ und die, die bei 37°C bis 42°C ihr Optimum hatten, als „closely related vibrios“ bezeichnet. Durch SEBALD und VERON wurde 1963 erstmals das Genus Campylobacter beschrieben. Die beiden unterschieden zwischen nicht mikroaerophilen und mikroaerophilen, sowie Kohlenhydrate nicht verstoffwechselnden Vibrionen, wobei sie die letztgenannten als Campylobacter bezeichneten. Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde die Gattung Campylobacter später der Familie der Spirillaceae zugeordnet (RITCHIE et al., 1966).

Das Wort Campylobacter stammt aus dem Griechischen und „kampylos“ heißt gekrümmt. Die Gattung Campylobacter, sowie die Gattung Arcobacter gehören beide zu der Familie der Campylobacteriaceae. Beide Gattungen sind phylogenetisch eng verwandt und in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich (VANDAMME und DE LEY, 1991). Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter gehören gemeinsam mit dem Genus Spirillum zur rRNA-Superfamilie VI der Klasse Proteobacteria (ROLLE und MAYR, 2002).

Der Gattung *Campylobacter* gehören gramnegative Bakterien mit einer Größe von 0,2-0,9 µm x 0,5-5,0 µm an. Sie zeigen eine schlanke, schraubig gedrehte, stäbchen-ähnliche Form und bewegen sich durch ihre monotriche Begeißelung korkenzieherartig fort (ROLLE und MAYR, 2002). In älteren Kulturen können sich kokkoide Degenerationsformen ausbilden (JONES et al., 1993). Bakterien der Gattung *Campylobacter* bilden keine Sporen und wachsen unter verminderter Sauerstoffspannung. Die Bebrütung erfordert ein Gasgemisch aus 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 85 % N<sub>2</sub> (KIST, 1983). Sie sind weder in der Lage, Kohlenhydrate zu fermentieren, noch sie zu oxidieren (ROLLE und MAYR, 2002). Sie sind Oxidase positiv, reduzieren Nitrat und bilden Katalase (BISPING und AMTSBERG, 1988). PENNER und HENNESSY entwickelten 1980 und LIOR et al. 1982 ein Serotypisierungsschema für *Campylobacter*. *Campylobacter* (C.) besitzen thermostabile und thermolabile Oberflächenantigene, die bei *Campylobacter jejuni* (C.jej.) und *Campylobacter coli* (C.c.) eine Einteilung in verschiedene Serovare erlaubt. Nach dem Schema von LIOR et al. (1982) lassen sich Serogruppen aufgrund von hitzelabilen Antigenen unterscheiden. PENNER et al. (1983) entwickelten auf der Basis von hitzestabilen Antigenen von Oberflächen-Lipopolysacchariden ein System zur Serotypisierung von C..

Aufgrund ihres Wachstumsverhaltens bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen wird zwischen „thermophilen“ und „nicht thermophilen“ C. unterschieden. PENNER (1991) unterteilte die Gattung C. in zwei Gruppen mit jeweils einigen Untergruppen auf.

Nomenklatur der Gattung *Campylobacter* nach PENNER ( 1991):

Echte *Campylobacter*

- Thermophile enteropathogene *Campylobacter*
  - *C. jejuni* ssp. *jejuni*
  - *C. coli*
  - *C. lariidis*
  - *C. upsaliensis*
  
- Andere echte *Campylobacter*
  - *C. fetus* ssp. *fetus*
  - *C. fetus* ssp. *venerealis*
  - *C. hyointestinalis*
  - *C. sputorum* Biovar *sputorum*
    - Biovar *bubulus*
    - Biovar *fecalis*
  - *C. mucosalis*
  - *C. concisus*

Die thermophilen *Campylobacter* *C.jej.* und *C.c.* können bei einer Vielzahl von warmblütigen Tieren isoliert werden. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei ungefähr 42°C; in der Umwelt können sie sich aufgrund ihrer relativ hohen Mindest-Wachstumstemperatur, die bei 28°C bis 30°C liegt, nicht vermehren. Sie sind allerdings in der Lage, für mehrere Monate in kaltem Wasser zu überleben (SKIRROW, 1994). PALUSZAK und OLSZEWSKA (2000) untersuchten die Überlebensfähigkeit von *C.jej.* in gelagerter Rindergülle. Dabei stellten sie fest, dass infizierte Bestände einen wesentlichen Beitrag bei der Verbreitung von *C.* in der Umwelt leisten. Die Lagerungstemperatur der Gülle spielte eine große Rolle bei der Reduktion der Keime. Am längsten konnten die Keime bei einer Lagerungstemperatur von 4°C überleben (durchschnittlich 41 Tage); um 29,1 Tage kürzer war die Überlebenszeit bei einer Lagerung der Gülle bei 20°C. Wurde die Gülle bei 50°C gelagert, konnten nach 240 min *C.* nicht mehr nachgewiesen werden. In der oben beschriebenen Studie wurden die Bakterien der Gülle in einer höheren Konzentration zugegeben, als dies in der Praxis beschrieben ist. Auch in einem Versuch von

BLASER et al. (1980) überlebten *C.* in einer Umgebungstemperatur von 4°C länger als bei 25°C. Bei Umgebungstemperaturen von 4°C konnten die Erreger noch nach drei Wochen aus Kotproben isoliert werden und ihren Studien zur Folge können *C.* bis zu vier Wochen im Grundwasser überleben. Ganz allgemein überleben *C.* in der Umwelt aber nur sehr schlecht, da sie auf verschiedene Umweltfaktoren sehr empfindlich reagieren, wie z.B. auf hohe Temperaturen, einen niedrigen pH-Wert (DOYLE und ROMAN, 1981), auf den Sauerstoffgehalt (HOFFMAN et al., 1979) oder auf Feuchtigkeitsmangel (DOYLE und ROMAN, 1982). Ein pH-Wert, der unter 3,0 liegt, wirkt sich laut BLASER et al. (1980) nachteilig auf das Überleben von *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* aus. OBIRI-DANSO et al. (2001) untersuchten den Effekt von UV-Strahlung und Temperatur auf das Überleben verschiedener *C. spp.*. Dabei wurde unter anderem *C.jej.* in Flusswasser künstlichem Sonnenlicht ausgesetzt, welches der Intensität der Sonnenstrahlung an einem sonnigen Junitag entsprach. Nach einer 40-minütigen Bestrahlung war kein Wachstum von *C.* mehr nachweisbar. Bei Dunkelheit zeigte sich, dass das Überleben temperaturabhängig war.

### **II.1.2 Pathogenität von *Campylobacter***

Bakterien der Gattung *C.* verursachen zum einen eine akute enterale und zum anderen eine Infektion der Geschlechtsorgane bei Mensch und Tier. Bis heute wurden 15 Spezies beschrieben, wobei vor allem *C.c.* und *C.jej.* mit Erkrankungen des Menschen assoziiert wurden (RKI, 2001). Ganz im Gegensatz zu Salmonellen vermehren sich *C.* bei Umgebungstemperaturen nicht in einem Lebensmittel oder auf der Oberfläche von Arbeitsgeräten (BORCH et al., 1996). Die von den Salmonellen bekannte „Langzeit Kreuz-Kontamination“, wie z.B. eine Übertragung des Erregers von Arbeitsgeräten, spielt bei *C.* keine Rolle, sondern vielmehr die „Kurzzeit Kreuz-Kontamination“, also die Übertragung des Erregers direkt in die Mundhöhle (BUTZLER und OOSTEROM, 1991). Zu Beginn einer *C.*-Infektion des Menschen sind Veränderungen des Darmes in Bereichen des Jejunums und des proximalen Anteils des Ileums zu erkennen, die sich allerdings meistens auf das restliche Ileum und das Colon ausbreiten. Die Mukosa zeigt entzündliche Veränderungen mit der Bildung von

Abszessen im Bereich der Krypten, die nicht zu unterscheiden sind von Veränderungen, wie sie bei einer Salmonellen- oder Shigellen- Infektion zu finden sind. Die Mesenteriallymphknoten sind meist entzündlich verändert (SKIRROW, 1994). Folgende Eigenschaften des Keimes sind maßgeblich für das gute Angehen einer C.-Infektion: zum einen ist dies die spiralige Gestalt des Erregers und zum anderen die bewegliche Geißel, die ein korkenzieherartiges Durchbohren der mukösen Schleimhaut ermöglicht, was anderen geraden Bakterien nicht gelingt. Des weiteren wurden von DE MELO und PECHÈRE (1990) spezielle **Outer Membrane Proteins** (OMP's) bei C.jej. entdeckt, die es dem Erreger ermöglichen, an die Epithelzellen des Darmes zu binden. Allerdings setzt dies ein intaktes **Flagellum** für die Zellinvasion voraus (GRANT et al., 1993). MOROOKA et al. (1985), sowie UEKI et al. (1987) betrachteten eine bewegliche Geißel als Voraussetzung für eine Besiedelung des Darmes. Die Struktur der Geißel selbst wurde von WASSENAAR et al. (1993) als ausschlaggebend für die Kolonisation angesehen, unabhängig von der Beweglichkeit des Erregers. Hierbei war die Zusammensetzung des Geißelproteins aus Flagellin Typ A oder B von Bedeutung (GRANT et al., 1993; WASSENAAR et al., 1994).

C. weisen ebenso wie andere gramnegative Bakterien **Lipopolysaccharide** in ihrer Zellwand auf, die als Endotoxine wirken (SKIRROW, 1994). Als Virulenzfaktoren werden von ROLLE und MAYR (2002) Enterotoxine, Zytotoxine und das Invasionsvermögen beschrieben. Bei einigen Stämmen konnte außerdem ein „Cholera-like enterotoxin“ nachgewiesen werden. Klinische und experimentelle Untersuchungen ergaben Hinweise auf die Produktion von hepatotoxischen Faktoren (KITA et al., 1990). Das Kolonisationsvermögen von C.jej. konnte durch in vivo-Passagen gesteigert werden (CAWTHRAW et al., 1996). Schon eine einzige in vivo-Passage verringerte die Infektionsdosis, die notwendig war, um eine vollständige Kolonisation des Blinddarmes zu erreichen. Von einer Steigerung der Virulenz sprachen SANG et al. (1989), nachdem ein C.jej.-Stamm in Geflügel passagiert worden war.

### II.1.3 **Campylobacter-Infektionen beim Menschen**

Durch *C.* hervorgerufene Erkrankungen haben in der Humanmedizin immer mehr an Bedeutung gewonnen. Eine Campylobacteriose stellt meist eine durch Nahrungsmittel bedingte Infektion dar (RKI, 2001). Bereits 1980 stellten SVEDHEM und KAJISER, sowie 1994 NOTERMANS bei gastrointestinalen Erkrankungen *C.* als den häufigsten Erreger fest. 1998 lagen lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *C.* in **Großbritannien**, den **Niederlanden** und **Kanada** an erster Stelle vor den Salmonellen. Das BgVV (2000a) wies darauf hin, dass *C.* auch in den **skandinavischen Ländern** und in der **Schweiz** bei Lebensmittel-Infektionen vor den Salmonellen rangierten. Die oben genannten Beobachtungen waren nicht nur auf ein gehäuftes Auftreten von *C.*-Infektionen zurückzuführen; wahrscheinlicher war die Tatsache, dass diesem Keim mehr Beachtung geschenkt wurde (BgVV, 2000a). In **Europa** konnte während der warmen Jahreszeit ein gehäuftes Auftreten an Erkrankungen durch *C.* beobachtet werden (RKI, 1999). In **Deutschland** lag die Häufigkeit in einigen Bundesländern bei 10 bis 50 Erkrankungen pro 100000 Einwohnern. Betrachtete man in Deutschland die bakteriellen Darmerkrankungen, so lagen die Salmonellen-Infektionen vor den *C.* bedingten Infektionen (RKI, 1999). Starke regionale und auf Bundesländer bezogene Unterschiede führten zu unterschiedlichen Meldefrequenzen. So gab es in Deutschland einzelne Bundesländer, die im Jahre 2000 über dem bundesdurchschnittlichen Inzidenzwert von 68,8 gemeldeten Fällen pro 100 000 Einwohner lagen. In Hamburg war der Unterschied so gravierend, dass *C.*-Infektionen häufiger diagnostiziert wurden als Salmonellen-Infektionen. Das Interesse der behandelnden Ärzte sowie der Labordiagnostiker führte zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen (BgVV, 2000b). Für das Jahr 2001 wurden in Deutschland insgesamt 54 410 *C.*-Fälle gemeldet. Dies entsprach einer durchschnittlichen Inzidenz von 66,2 Fällen pro 100 000 Einwohner. In den Fällen, in denen genauere Angaben zur Spezies vorlagen, wurden *C.jej.* zu 84,5%, *C.c.* zu 13,1%, *C.lari* zu 0,5% und *C.fetus* ssp. zu 0,5% nachgewiesen (RKI, 2002). Kinder bis zu einem Alter von 6 Jahren waren häufiger von einer *C.*-Infektion betroffen als Erwachsene mit Ausnahme der 18- bis 35- Jährigen, bei denen ebenfalls ein gehäuftes Auftreten zu verzeichnen war (RKI, 2001).

Die Infektion erfolgte meist oral durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, Trinkwasser oder durch Kontakt mit infizierten Tieren und deren Ausscheidungen (KRAUSS et al., 1997). Im Gegensatz zu den Salmonellen oder Escherichia coli (E.coli) vermehren sich die Keime bei herkömmlichen Umgebungsbedingungen nicht im Lebensmittel. Die erforderliche Anzahl an Keimen kann allerdings durch eine Kreuzkontamination im Küchenbereich oder aber eine unzureichende Erhitzung der Lebensmittel erreicht werden. Auch rohe oder nicht ausreichend erhitzte Milch stellen eine Infektionsquelle dar (BgVV, 1998). Als Hauptinfektionsquelle für eine humane C.-Infektion konnte unzureichend erhitztes oder rekontaminiertes Geflügelfleisch angesehen werden. Nicht gechlortes Trinkwasser und der Kontakt zu Heimtieren kam als weitere Infektionsquelle in Frage (RKI, 2001). Die Ergebnisse durchgeführter C.-Serotypisierungen ließen erkennen, dass zwischen C.-Serotypen von Hühnern und humanen C.-Isolaten häufiger eine positive Korrelation festzustellen war, als dies zwischen humanen und C.-Isolaten von Schweinen der Fall war (BANFFER, 1985). Durch vergleichende Untersuchungen von C.-Schweineisolaten und humanen C.-Isolaten konnten KRAMER et al. (2000) belegen, dass Schweinefleisch nur zu einem geringen Anteil für humane C.-Infektionen verantwortlich war.

### **II.1.3.1 Pathogenese und Klinik beim Menschen**

Die Aufnahme einer relativ geringen Anzahl an C.-Keimen von ungefähr 500 kann zu einer Gastroenteritis führen (BLACK et al., 1988; BgVV, 1998). C.jej. kann durch seine Spiralform und hochgradige Motilität die schützende Mukusschicht der Darmschleimhaut passieren und sich an die Enterozyten des Intestinaltraktes anheften. Eine Diarrhoe wird durch die Freisetzung von stammspezifischen Toxinen, vor allem Enterotoxine und Zytotoxine, ausgelöst (WALLIS, 1994). C.jej. ist beim Menschen weltweit eine der häufigsten Ursachen der bakteriellen Enteritis und Enterokolitis. Andere darmpathogene C.-Arten sind von untergeordneter Bedeutung. Der Verlauf und die Symptome einer C.jej. Infektion sind nicht sehr charakteristisch und dadurch ist es klinisch nicht möglich, sie von anderen Pathogenen abzugrenzen. Die Inkubationszeit beträgt gewöhnlich 2-5 Tage, sie kann aber in Ausnahmefällen bis zu 10 Tage dauern. Das Prodromalstadium, welches von einigen Stunden bis zu

wenigen Tagen dauern kann, ist gekennzeichnet durch Unwohlsein, Bauch- und Kopfschmerzen, Benommenheit, Appetitlosigkeit, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Fieber. Die profuse Diarrhoe wird von Bauchkrämpfen begleitet. Die Stuhlbeschaffenheit ist wässrig, zum Teil auch schleimig. Mikroskopische Untersuchungen von Stuhlproben lassen inflammatorisches Exsudat, Leukozyten, frisches Blut, sowie die charakteristische Morphologie des Erregers selbst erkennen. Die Durchfälle sistieren meist im Verlauf von 2 bis 10 Tagen. Auch nach deren Abklingen können Unwohlsein und die Bauchschmerzen noch einige Tage bis Wochen anhalten (BUTZLER und OOSTEROM, 1991). Im allgemeinen ist eine Erregerausscheidung noch etwa drei Wochen nach Abklingen der Enteritis nachweisbar (SVEDHEM und KAIJSER, 1980). An Komplikationen sind das Appendicular Syndrom, Cholecystitis, Peritonitis, Septikämie, Meningitis, Arthritis und das Erythema nodosum bekannt (BUTZLER und OOSTEROM, 1991).

Das Auftreten des Guillan-Barré-Syndroms (GBS) ist ebenfalls assoziiert mit einer C.-Infektion. Dieses Syndrom besteht in einer akuten neurologischen Erkrankung. Dabei kann es zu aufsteigenden Paralysen der peripheren Nerven über eine Beeinträchtigung der Atemmuskulatur bis hin zu Todesfällen kommen (NACHAMKIN et al., 1998).

### **II.1.3.2 Immunantwort bei einer Campylobacter-Infektion des Menschen**

Beim Menschen ist die Immunantwort auf eine C.-Infektion ähnlich der anderer Infektionskrankheiten. Die IgG- und IgM-Spiegel im Serum stiegen aufgrund der Infektion an, blieben für drei bis vier Wochen erhöht und sanken dann 90 Tage nach erfolgter Infektion auf ihren Ausgangswert zurück (BLASER und DUNCAN, 1984). Der IgA-Spiegel im Serum stieg während der ersten Wochen der Infektion und fiel dann sehr schnell ab (KALDOR et al., 1983; BLASER und DUNCAN, 1984; MASCART-LEMONE et al., 1987). Spezifische IgG-, IgM- und IgA- Antikörper in Humansen wurden auch von SKIRROW (1994) beschrieben. Antikörper, welche spezifisch für Flagellin- und Oberflächenproteine waren, zeigten eine schützende Wirkung vor einer Reinfektion mit C.. Nur wenige Infektionen genügten bei Kindern in Entwicklungsländern, um durch stetig ansteigende IgA-Spiegel in der Kindheit eine schützende Immunität aufzubauen. Auch BLASER und DUNCAN (1984) berichteten

von einer mit zunehmendem Alter sinkenden Infektionsrate bei Kindern in Entwicklungsländern. Auch diese Autoren begründeten diese Beobachtung ebenfalls durch die gebildete Immunität nach der Exposition gegenüber C.. Antikörper der Klassen IgG und IgA waren in einer Studie von LANGE et al. (1999) zu Beginn der Erkrankung, sowie 5 Monate später, mit einem niedrigeren Titer, vorhanden. Antikörper der Klasse IgM waren nur zu Beginn der Infektion nachweisbar und waren während der folgenden 5 Monate nicht mehr messbar. IgA-Antikörper konnten auch in den Faeces und im Urin einiger Erkrankter während der ersten Wochen der akuten Infektion nachgewiesen werden (LANE et al., 1987; NACHAMKIN und YANG, 1992; WU et al., 1993). Die erworbenen zirkulierenden Antikörper wiesen offenbar auf eine lokale Antwort der Darmmukosa hin und wurden als fäkal- und urinspezifisch sezernierte IgA-Antikörper bezeichnet (LANE et al., 1987).

Die Untersuchung von **natürlich** infizierten Menschen hatte gezeigt, dass campylobacterspezifische Antikörper-Spiegel als Antwort auf eine stattgefundene Infektion anstiegen (WALZ et al., 2001). Untersuchungen an freiwilligen Probanden erbrachten, dass eine **experimentelle** Infektion mit C.jej. sowohl Serumantikörper, als auch intestinale Antikörper gegen den Erreger induzierte (BLACK et al., 1992). Menschen, die durch eine vorangegangene C.-Infektion Antikörper gegen C. aufwiesen, waren nicht vor einer erneuten Besiedelung des Darmtraktes mit den Erregern geschützt, wohl aber vor der Ausbildung von Symptomen bei einer Reinfektion. Als mögliche Erklärung wurde diskutiert, dass die Antikörper vor allem gegen Virulenzfaktoren gerichtet waren, die Krankheitserscheinungen verursachten, nicht jedoch gegen Faktoren, die lediglich die Ansiedelung begünstigten (NEWELL und NACHAMKIN, 1992). Die Exposition empfänglicher Menschen gegenüber C.jej. schien zu einer Resistenz gegenüber einer klinischen Erkrankung auf Grund der Entwicklung einer schützenden Immunität zu führen. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurden von CAWTHRAW et al. (2000) die C.jej. spezifischen IgG- und IgM- Antikörper-Spiegel im Serum von in Geflügelschlachthöfen arbeitenden Menschen bestimmt. Diese Menschen waren ständig C.jej. ausgesetzt, aber offenbar erkrankten sie selten an einer Campylobacteriose. Seren von Kurzzeit-Arbeitern (Beschäftigung < 1 Monat), Langzeitarbeitern und Blutspendern wurden untersucht. Es wurden deutlich höhere spezifische IgG-Antikörper-Spiegel bei Langzeitarbeitern, als bei irgend einer anderen Gruppe festgestellt. Von besonderer Bedeutung war ein

Flagellinprotein und ein 40 kDa Polypeptid (CAWTHRAW et al., 2000). In einer Studie von KANTELE et al. (1988) wurde bei 23 von 24 Patienten eine Woche nach Beginn der Enteritis eine dramatische Zunahme aller Zellen, die aktiv Immunglobuline sezernierten, festgestellt. Die meisten dieser Zellen produzierten IgA. Zellen, die spezifische Antikörper gegen C.jej. produzierten, ließen sich zu dieser Zeit auch nachweisen, machten aber nur einen Teil der Gesamtantwort aus. Diese Daten ließen vermuten, dass die Enteritis eine kräftige, anscheinend polyklonale Antwort induzierte, die Antikörper gegen die normale intestinale Flora mit einschloss.

STRID et al. (2001) führten eine Untersuchung der Antikörper-Antworten auf C.-Infektionen mittels ELISA in einer zweijährigen Studie an 210 Patienten durch. Hierzu wurde ein ELISA entwickelt, um IgG-, IgM- und IgA- Antikörperspiegel gegen C.jej. und C.c. in humanen Serumproben zu bestimmen. Als Antigen wurde eine Kombination aus zwei C.jej.-Serotypen im ELISA verwendet. 631 Seren von 210 Patienten mit bestätigten C.-Enteritiden wurden in verschiedenen Intervallen nach der Infektion untersucht. Eine Kontrollgruppe mit 164 Seren wurde herangezogen, um den cut-off-Wert für negative Ergebnisse zu bestimmen. Ein erhöhter IgG-Spiegel konnte über einen Zeitraum von viereinhalb Monaten nach der Infektion beobachtet werden. Variationen des Absinkens der verschiedenen Immunglobuline wurden deutlich. IgA- und IgM- Antikörper waren während der akuten Phase der Infektion erhöht (bis zu zwei Monate nach Beginn der Infektion). Die Antikörper-Antwort hing meist nicht von der C.-Spezies oder dem C.jej. Serotyp ab, allerdings mit der wichtigen Ausnahme der Antwort auf C.jej. O:19, des Serotyps, der am häufigsten mit dem Guillan-Barré-Syndrom (GBS) assoziiert war. Alle Patienten, die mit diesem Serotyp infiziert waren, hatten im Vergleich zu anderen C.jej.- und C.c.- Serotypen, höhere Level an beiden, IgM- und IgA- Spiegeln.

### II.1.4 Immunantwort bei einer Campylobacter-Infektion bei Tieren

Studien zur Immunantwort beim **Schwein** auf eine C.-Infektion wurden in der Vergangenheit nicht durchgeführt. Die Immunantwort bei anderen Tierarten ist mit der des Menschen vergleichbar. Nach der experimentellen Infektion von Menschen und

Kaninchen schützte der ansteigende IgA-Spiegel vor einer Infektion und Erkrankung beim Menschen und vor einer Kolonisation und Bakteriämie beim **Kaninchen** (BLACK et al.,1988; BURR et al.,1988). Untersuchungen mit **Geflügel** zeigten, dass eine aktive Immunisierung die Anzahl an intestinalen Infektionen mit C.jej. reduzieren konnte. In einer Untersuchung von SCHULZE und ERLER (2002) konnten hohe maternale IgG-Titer im Serum von SPF-Küken über einen Zeitraum von neun Tagen nachgewiesen werden. Ein Abfall dieser Titer konnte bis zum 15. Lebenstag beobachtet werden. Keine maternale, sowie keine in diesem Zeitraum von den Küken selbst gebildete nennenswerte IgA- und IgM- Titer ließen sich bei diesen Tieren nachweisen. Außerdem wurden zwei und acht Tage alte SPF-Küken mit C.jej. oral infiziert und die Immunantwort auf IgG, IgM und IgA untersucht. Dabei zeigte sich, dass zwar ein Anstieg an IgG zu verzeichnen war, die IgM- und IgA- Spiegel nach künstlicher Infektion aber nicht anstiegen. SCHULZE und ERLER (2002) beschrieben eine anscheinend positive Korrelation zwischen den C.-Keimzahlen im Zäkum und der IgG-Antwort im Serum. Die hohen Antikörperspiegel schützten nicht vor einer Besiedelung des Zäkums mit C.. Gegenteilige Ergebnisse veröffentlichten WIDDERS et al. (1996) mit intraperitoneal am 16. und 29. Lebenstag immunisierten Broilern. Immunisiert wurde mit gereinigtem C.-Flagellinprotein und einer Kombination aus gereinigtem C.-Flagellinprotein und hitzeinaktiviertem C.jej.-Antigen. Am 36. Lebenstag wurden die immunisierten Tiere, wie auch einige Kontrolltiere, mit Broilern in Kontakt gebracht, die den für die Immunisierung verwendeten C.-Stamm ausschieden. Nach Euthanasie am 43. Lebenstag wurde die immunologische und bakteriologische Reaktion der Tiere auf die Immunisierung und die Infektion untersucht. Dabei zeigten die mit einer Kombination aus gereinigtem Flagellinprotein und hitzeinaktiviertem C.jej.-Antigen immunisierten Tiere im Blinddarminhalt eine signifikante Reduktion der C. Kolonie-bildenden-Einheiten (KbE) im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrolltieren. Bei den nur mit gereinigtem Flagellinprotein immunisierten Tieren konnte diese Reduktion nicht beobachtet werden. Eine schützende Immunität wurde auch durch die intramuskuläre Verabreichung eines C.jej.-Stammes an Küken nicht aufgebaut. Die Vakzine wurde mit und ohne Adjuvans, sowie mit und ohne zusätzliche orale Verabreichung eines nicht kolonisierenden Stammes eingesetzt (ZIPRIN et al., 2002a). Durch eine Präinkubation von C.jej. mit Immunseren von Kaninchen und C.-Antikörper-Extrakten aus der Gallenblase von Geflügel, konnte die Fähigkeit der Bakterien zur Kolonisation

vermindert werden (STERN et al., 1990). SAHIN et al. (2001) berichteten von Küken, die in den ersten beiden Lebenswochen frei von C. waren und begründeten die Resistenz des Intestinaltraktes junger Küken mit dem Vorkommen von maternalen Antikörpern. In dieser Studie konnte hauptsächlich ein Anstieg des IgG-Spiegels beobachtet werden; IgM- und IgA- Spiegel stiegen hingegen in viel geringerem Maße an. Den Gipfel der maternalen Antikörperkonzentration erreichten die Küken am 3. bis 4. Lebenstag; danach sank der Spiegel bis zur 2.-3. Lebenswoche kontinuierlich bis auf nicht mehr messbare Werte ab (KOWALCZYK et al., 1985). Eine Studie an **Mäusen** von PANCORBO et al. (2001) zeigte, dass enterotoxische C.-Stämme im Gegensatz zu nicht enterotoxischen in der Lage waren, die Immunantwort zu beeinflussen. Die von enterotoxischen C.-Stämmen produzierten Toxine führten zu einer verminderten Synthese von IgM und IgG. Die Immunantwort von **Hunden** wurde von NEWTON et al. (1988) untersucht. Es zeigte sich, dass bei acht Wochen alten Welpen aus einem mit C. infizierten Bestand ein spezifischer IgG Anstieg zu verzeichnen war. Ältere Hunde wiesen, außer Hündinnen während dem Zeitabschnitt zwischen Geburt und Säugephase, niedrigere Antikörper-Titer auf. **Frettchen** zeigten nach einer Infektion mit C. eine spezifische Immunantwort, die nicht vor einer Kolonisation mit C. schützte, wohl aber vor einer Erkrankung und Diarrhoe. Jungtiere immuner Mütter (mit hohen Antikörpertitern) waren durch die erworbene passive Immunität geschützt (BELL und MANNING, 1990).

### II.1.5 Antigene Strukturen

Zur Diskussion und Frage, welche Antigene für eine Immunantwort verantwortlich sind, liegen verschiedene Untersuchungsergebnisse vor. NEWELL und NACHAMKIN (1992) waren der Meinung, dass nur wenige Protein-Antigene für die schützende Immunität gegen C.-Infektionen wichtig waren. In anderen Untersuchungen wurde belegt, dass Serumantikörper von dem Erreger endemisch ausgesetzten Personen gegen eine große Anzahl an Antigenen gerichtet waren (CAWTHRAW et al., 2000). 82% der in dieser Studie untersuchten humanen Seren wiesen Antikörper auf, die gegen ein 40 kDa Polypeptid und bzw. oder gegen **Flagellinproteine** gerichtet waren. In einer Untersuchung von CAWTHRAW (1994) zeigte sich mittels Western-Blot-Technik, dass IgG, IgM und IgA sich hauptsächlich gegen ein 62 kDa großes

Flagellinprotein richteten. Das Flagellum von C.jej. war auch laut TOMPKINS (1992) als Antigen von großer Bedeutung. In einer Untersuchung von WIDDERS et al. (1998) wurde festgestellt, dass Flagellin-spezifische Antikörper einen Hauptanteil der Immunantwort in Seren und intestinalen Sekreten von zuvor immunisierten Broilern darstellten. Epitope in jeder Region des Flagellinproteins wirkten immunogen. Die Antikörper bildeten allerdings, im Gegensatz zu einer Immunantwort auf eine Kombination aus ganzem C.-Antigen und gereinigtem Flagellinprotein, keinen Schutz vor einer C.-Infektion. WIDDERS et al. (1998) erklärten dies mit dem Unvermögen zur Bindung von ganzen C.jej.-Zellen durch die Flagellin-spezifischen Antikörper.

In einer Untersuchung im Geflügelbereich wurde von SAHIN et al. (2001) gezeigt, dass die Antikörper-Antwort im Serum, wie auch im Eidotter, gegen multiple **Membrankomponenten** von C.jej. gerichtet war, die von 19 bis 107 kDa reichten. Die stärkste Immunantwort war gegen ein Lipopolysaccharid von C.jej. gerichtet, welches im Immunoblot unterhalb des 19-kDa-Markers registriert werden konnte. Der angewandte Immunoblot machte deutlich, dass Geflügelantikörper mit einer Vielzahl von Komponenten der äußeren Membran von C.jej. reagierten. Bei wiederholten Untersuchungen von aufeinanderfolgenden Subkulturen derselben C.-Isolate konnten PATTON et al. (1985) voneinander abweichende Antigenfaktoren feststellen. Die spezifische Immunantwort kann möglicherweise durch eine Phasen- oder Antigenvariation von C. in die Irre geführt werden. Dabei kommt es zu Veränderungen der „antigenen“ Oberflächendeterminanten. Die unspezifischen Abwehrreaktionen des Wirtes können durch die teilweise Ausbildung einer Serum- und Phagozytoseresistenz umgangen werden (STURZENHECKER, 1995). 18-kDa Omp (18-kDa Outer Membrane Protein) ist ein Protein der äußeren Membran und gehört zur Familie der PALs (Peptidoglycan-assoziierte Lipoproteine). Diese waren in C.jej. zahlreich enthalten (BURNENS et al., 1995). In **Abbildung 1** sind die in der Literatur erwähnten Immunogene von C. dargestellt.

In einer Untersuchung von JANVIER et al. (2000) wurde die humorale Immunantwort von 153 Patienten mit Hilfe der KBR und eines Western-Blot-Assays untersucht. Ein positiver Titer bei der Komplementbindungsreaktion ist immer verdächtig auf eine frische oder kürzlich abgelaufene Infektion. Ziel der Untersuchung war es, ein Antigen für die Diagnose von Infektionen mit C.jej. zu finden. Die erste Gruppe (mit 79 Seren)

setzte sich aus Patienten mit einer C.jej.-Infektion zusammen, die an Enteritis (n=16), am GBS (n=40) und an Arthritis (n=23) litten. Eine zweite Gruppe mit 49 Seren bestand aus gesunden Blutspendern und eine dritte Gruppe mit 25 Seren aus Kindern unter vier Jahren. Bei der KBR waren 88,6% der mit C.jej. infizierten Patienten, 28,5% der gesunden Blutspender und keines der Kinder seropositiv. Der Westernblot ermöglichte die Erkennung der Antikörper, die gegen Antigene gerichtet waren, die von 14 bis 67 kDa reichten. Bei allen erwachsenen Patienten und bei 32% der Kinder konnte eine immunologische Bande bei 67 kDa nachgewiesen werden. Die korrespondierenden Antigene waren wahrscheinlich ein Flagellinprotein und bzw. oder ein Hitzeschockprotein. Diese beiden Proteine hatten ein ähnliches Molekulargewicht und wurden in gramnegativen Bakterien häufig nachgewiesen (THORNTON et al., 1990; WU et al., 1994; FUJIMOTO und FUJITA, 1999). Im Serum von Patienten, die an einer Infektion durch gramnegative Bakterien (ohne C.) litten, konnte häufig eine zweite Bande bei 14 kDa identifiziert werden. Dieses Antigen wurde als ein Lipopolysaccharid bzw. als ein Hitzeschockprotein bezeichnet und bezüglich einer Kreuzreaktion zwischen gramnegativen Bakterien schon mehrfach beschrieben (PERREZ-PERREZ et al., 1986; JOHANSEN et al., 1995). Aus diesem Grund wurden die Banden bei 67 kDa und 14 kDa als nicht spezifisch für eine C.-Infektion beurteilt. Drei Banden mit einem molekularen Gewicht von 29, 37 und 43 kDa wurden zu 86%, 84,8% und 91,1% bei den mit C.jej. infizierten Patienten nachgewiesen. Die Verwendung dieser drei Antigene schien hilfreich für die Entwicklung eines Assays zur direkten und indirekten Diagnose von C.-Infektionen zu sein. Bei dem 43 kDa Antigen handelte es sich um ein Major Outer Membrane Protein (MOMP) (BLASER und DUNCAN, 1984; BOLLA et al., 1995), welches neben einem Flagellinprotein eines der beiden Hauptimmunogene von C.jej. darstellte (JANVIER et al., 2000).

In einer Untersuchung von LÜNEBERG et al. (2001) wurden Ratten mit unterschiedlichen Antigen-Präparationen von C.jej.-Stämmen immunisiert. Diese entwickelten daraufhin hohe Titer an spezifischen Antikörpern. Lewis Ratten wurden entweder mit ganzen Zell-Lysaten, mit LPS-Präparationen oder Außenmembran-Präparationen von C.jej. immunisiert und geboostert. Die Antigen-Präparationen waren hoch immunogen und induzierten eine starke zelluläre und humorale Immunantwort.

## Abbildung 1 Lokalisation der Immunogene bei Campylobacter

LPS-Präparationen und Präparationen der ganzen äußeren Membran von C.jej. sind hochimmunogen und bewirken eine starke zelluläre und humorale Immunantwort (Lüneberg et al., 2001).

Omp 18 (18 kDa outer membrane protein) ist ein Protein der äußeren Membran, gehört zur Familie der Pal's (Peptidoglycan assoziierte Lipoproteine) und bewirkt eine mittellange humorale Immunantwort (Burnens et al., 1995).

äußere Membran = Lipopolysaccharidschicht

Zytoplasmamembran

67, 73,5 und 77,5 kD-Antigene: kommen nicht auf der Oberfläche der Bakterien vor; führen zu einer humoralen Immunität (Widders et al., 1998).

Gegen 40 kD Polypeptide und Flagellinproteine konnten in 82% der untersuchten humanen Seren Antikörper nachgewiesen werden. (Cawthraw et al., 2000).

Das 43 kDa-Antigen, auch major outer Membrane protein (MOMP) genannt, ist neben dem Flagellinprotein eines der beiden wichtigsten Immunogene für eine späte humorale Immunantwort (Janvier et al., 2000).

Flagellum

Alle Epitope in jeder Region der Flagellinproteine wirkten immunogen und führten zu einer späten humoralen und zellulären Immunantwort (Widders et al., 1998).

Flagellinproteine bewirken eine humorale sowie zelluläre Immunantwort. IgG und IgA sind zu Beginn der Erkrankung sowie fünf Monate später noch nachzuweisen, IgM sind nur zu Beginn der Erkrankung vorhanden (Lange et al., 1999).

## II.1.6 Vorkommen von *Campylobacter* bei Schweinen

Abgesehen vom Geflügel kommt dem Schwein als latentem Träger und Ausscheider von thermophilen *C.* von den landwirtschaftlichen Nutztieren die größte Bedeutung zu (WEBER, 1985; KRAUSS et al., 1997). Schwankungen zwischen Farmen, Zuchtbetrieben und Ländern bezüglich des Vorkommens von *C.*-Stämmen wurden von YOUNG et al. (2000) beschrieben. *C.c.* wurde unter den thermophilen *C.* als dominierend im Verdauungstrakt von Schweinen bezeichnet (WUTHE und VOLKHEIMER, 1986; GAULL et al., 2001), es konnte jedoch auch *C.jej.* aus Schweinekot isoliert werden (GÖRGEN, 1982; WEBER et al., 1985; STICHT-GROH, 1982). Schweine beherbergten nicht nur einen thermophilen *C.*-Stamm, sie konnten auch gleichzeitig mit *C.c.* und *C.jej.* infiziert sein (MADDEN et al., 2000). Auch GAULL et al. (2001) hielten die Möglichkeit einer Mehrfachinfektion von Schweinen mit verschiedenen *C.*-Stämmen für gegeben.

Die Pathogenität von *C.* für Schweine wurde schon seit längerer Zeit diskutiert, da *C.c.* nicht nur bei an Durchfall erkrankten Schweinen nachgewiesen werden konnte, sondern die Isolierung aus Kotproben auch bei den meisten gesunden Schweinen möglich war (GÖRGEN et al., 1983; SKIRROW, 1994). Kulturelle Untersuchungen von Kotproben gesunder und darmerkrankter Schweine zeigten, wie in **Tabelle 1** dargestellt, bei zwei Untersuchungsgruppen (gesunde und darmerkrankte Schweine), dass in verschiedenen Altersklassen *C.* zu 35% bis 100% isoliert werden konnten (GÖRGEN et al., 1983). Sie isolierten *C.* bei gesunden Schweinen zu 48% bis 100% und erwähnten die Möglichkeit, dass dieser Keim zur normalen Darmflora von Schweinen gehören könnte und bezeichneten die antibiotische Behandlung von darmerkrankten Schweinen als mögliche Ursache für die teilweise geringeren Nachweisraten gegenüber den gesunden Tieren.

**Tabelle 1 Nachweisraten von Campylobacter aus Kotproben vergleichend bei gesunden und bei darmerkrankten Schweinen (nach GÖRGEN et al., 1983)**

Alters- und Gewichtsklasse	Gesunde Schweine	Schweine mit Darmerkrankungen
Saugferkel bis 3 Wochen	48%	35,7%
Saugferkel 3-6 Wochen bis ca. 12 kg	100%	37,5%
Muttersauen der Saugferkel	100%	75%
Absatzferkel 15-25 kg	66,7%	96,2%
Läufer 25-50 kg	90%	90%
Schweine 10-110 kg	88,2%	50%

8

Experimente mit gnotobiotischen Schweinen zeigten, dass Schweine frei von *C.jej.* und von *C.c.* geboren wurden (BOOSINGER und POWE, 1988). In einer in Deutschland durchgeführten Untersuchung, in welcher 736 Kotproben von klinisch gesunden Schlachtschweinen auf *C.* untersucht wurden, ließen sich aus 54,3 % der Proben thermophile *C.* isolieren, wobei 38,3% der Isolate als *C.jej.* und 61,7% mit Hilfe der Hippuratspaltung als *C.c.* identifiziert wurden (WEBER et al., 1985). STICHT-GROH (1982) erhielt aus 173 untersuchten Kotproben von Schlachtschweinen ähnliche Ergebnisse. Aus 59% der Proben konnten *C.* isoliert werden, wobei 24% der Isolate als *C.jej.* identifiziert wurden. In den Niederlanden zeigte eine Untersuchung von WEIJTENS et al. (1993), dass 85% der Mastschweine über die gesamte Mastperiode Träger von *C.* waren und deshalb Schweine als natürliches Reservoir für *C.* angesehen wurden (WEIJTENS et al., 1993; HARVEY et al., 1999). WEBER et al. (1985) bezeichneten *C.* als zur normalen Darmflora des Schweines gehörender Keim. In einer epidemiologischen Studie in der Umgebung von Leipzig, durchgeführt von GAULL et al. (2001), wurden Kotproben von 60

Mastschweinen und von 30 Ferkeln mehrmals bis zur Schlachtung bakteriologisch auf C. untersucht. Dabei konnten 376 C.-Isolate gewonnen werden, wobei es sich bei allen um C.c. handelte. Die Prävalenz von C. infizierten Mastschweinen lag während der Mastperiode und bei der Schlachtung zwischen 70% und 93%. Am Tage der Geburt waren alle untersuchten Ferkel C.-negativ, die Muttersauen hingegen alle C.-positiv. In den drei darauf folgenden Wochen waren dann bis zu 90% der Ferkel C.-positiv. Die Tiere schieden den Erreger teilweise ständig, teilweise aber auch intermittierend aus. Um ebenfalls die C. Prävalenz zu beleuchten, wurde eine Untersuchung auf einer Schweinefarm in den USA durchgeführt (YOUNG et al., 2000). Dabei wurden verschiedene Schweinegruppen (erwachsene Schweine, trächtige Sauen, Ferkel am Tage der Geburt, sowie entwöhnte Ferkel) ausgewählt und von jedem Tier Kotproben untersucht. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 2** detailliert zusammengestellt.

**Tabelle 2 Durch bakteriologische Kotuntersuchungen ermittelte Prävalenz von Campylobacter in einer Schweinefarm (nach YOUNG et al., 2000)**

	C. spp.	C. jejuni	C. coli	C.lari
Erwachsene Schweine	76%	76,3%	21%	2,6%
Trächtige Sauen	100%	89%	11%	0%
Ferkel am Tage der Geburt	57,8%	31,7%	68,3%	0%
Entwöhnte Ferkel	85%	82%	18%	0%

Die Inzidenz der untersuchten Kotproben bei den erwachsenen Tieren betrug 76%, wobei drei Viertel davon als C.jej. identifiziert wurden. Bei trächtigen Sauen konnten zu 100% C. isoliert werden, von denen 89% der Isolate C.jej. waren. Ferkel am Tage der Geburt waren zu 57,8% mit C. infiziert, wobei 68,3% dieser Isolate als C.c. identifiziert wurden. Entwöhnte Ferkel waren zwar mit 85% häufiger mit C. infiziert, C.jej. kam allerdings im Vergleich zu den neugeborenen Ferkeln mit 82% der Isolate deutlich häufiger vor. Laut YOUNG et al. (2000) konnte ein einzelnes mit C. infiziertes Schwein in einem geschlossenen Stall den Erreger sehr schnell auf die anderen Tiere

übertragen und somit die hohe Prävalenz verursachen. Die hohe Befallshäufigkeit bei neugeborenen Ferkeln konnte auf die stark befallenen Muttertiere zurückgeführt werden. Beobachtungen wiesen darauf hin, dass Ferkel durch ihre Mütter infiziert wurden (WEIJTENS et al., 1997) und die Besiedelung des Darmes neugeborener Ferkel schon in den ersten 24 Stunden nach der Geburt erfolgen konnte. HARVEY et al. (2000) untersuchten den Effekt eines sehr frühen Absetzens der Ferkel auf die Besiedelung des Darmes mit C.. Dazu bildeten sie mehrere Gruppen und setzten einige Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt ab, die dann ohne Kontakt zu Muttersauen versorgt wurden. Ein Teil der Ferkel verblieb bei den Muttertieren. Im Laufe der Studie wurden regelmäßig Kotproben auf C. untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tabelle 3** dargestellt

**Tabelle 3 Campylobacter-Prävalenz bei neugeborenen Ferkeln von Tag 1 bis Tag 20, vergleichend bei mutterlosen Ferkeln und Ferkeln, die bei den Sauen geblieben sind (nach HARVEY et al., 2000)**

Lebensalter in Tagen	1	2	12	20
Gruppe I	Campylobacter positive Proben/Proben-Gesamtzahl			
mutterlose Ferkel	7/14	13/14	0/14	0/14
Ferkel bei Sauen	6/9	8/9	8/9	8/9
Gruppe II				
mutterlose Ferkel	8/29	12/29	8/27	5/26
Ferkel bei Sauen	7/15	nicht untersucht	14/15	15/15

Diese Ergebnisse machten deutlich, dass neugeborene Ferkel vor einer Besiedelung mit C. durch eine Separation von infizierten Muttertieren bewahrt werden konnten (HARVEY et al., 2000). In einer von WEIJTENS et al. (1997) in den Niederlanden durchgeführten Untersuchung der Faeces von Muttersauen und deren Ferkel zeigte sich, dass in den meisten Kotproben der trächtigen Muttersauen und in allen Kotproben von Muttersauen nach der Geburt, C. nachzuweisen war. Bei bis zu zwei

Dritteln der Ferkel konnte in der ersten Lebenswoche *C.* kulturell nachgewiesen werden. Eine Infektion der Ferkel durch ihre Mütter konnte durch eine Übereinstimmung der *C.*-Subtypen von Sauen und deren Ferkel belegt werden. Nach acht Wochen waren 90% der untersuchten Ferkel mit *C.* infiziert. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte *C.*-Ausscheidung von Sauen um den Geburtszeitpunkt, sahen WEIJTENS et al. (1997) in der verminderten Resistenz des Intestinaltraktes durch den physiologischen Stress, dem die Schweine um den Geburtszeitpunkt ausgesetzt waren. Eine *C.*-Infektion bei nicht trächtigen, erwachsenen Schweinen breitete sich im Vergleich zu Ferkeln im Bestand viel langsamer aus. Eine Resistenz des Intestinaltraktes bei erwachsenen Schweinen durch eine stabile Darmflora verhinderte eine Kolonisation des Darmes durch die Erreger (WEIJTENS et al., 1999).

**Tabelle 4** beinhaltet bakteriologische Untersuchungsergebnisse von unterschiedlichen Schweinekotproben. Je nach Autor wurden unterschiedliche Altersklassen und Nutzungsarten untersucht.

**Tabelle 4 Campylobacter-Isolierungsraten aus Schweinekotproben nach verschiedenen Autoren**

Literaturstelle	Untersuchungsmaterial	Positiver C.-Nachweis	C.c.-Isolate	C.jej.-Isolate
STICHT-GROH (1982)	Kotproben von Schlachtschweinen	70%	23,38%	76,62%
GÖRGEN et al. (1983)	Kotproben von: <u>gesunden</u> Schweinen aller Altersklassen	80,5%	keine Angaben	keine Angaben
	<u>darmerkrankten</u> Schweinen aller Altersklassen	66,2%	keine Angaben	keine Angaben
WEBER et al. (1985)	Kotproben von Schlachtschweinen	54,3%	61,7%	38,3%
WEIJTENS et al. (1993)	Kotproben von Mastschweinen	85%	keine Angaben	keine Angaben
NIELSEN et al. (1997)	Kotproben von Schlachtschweinen	46%	95%	keine Angaben
BOTTELDORN et al. (2001)	Kotproben von Schweinen verschiedener Altersklassen	34%	100%	0%
GAULL et al. (2001)	Kotproben von:			
	neugeborenen Ferkeln	0%	0%	0%
	Ferkeln, 3 Wochen alt	90%	100%	0%
	Muttersauen	100%	100%	0%
	Mastschweinen	70%-93%	100%	0%

Experimentelle Infektionen von Ferkeln, die per Kaiserschnitt geboren und ohne Kolostrum aufgezogen wurden mit einem porcinen C.c.-Stamm ließen die Körpertemperatur der Ferkel ansteigen und lösten eine Diarrhoe aus. Konventionell aufgezogene Ferkel hingegen zeigten kaum klinische Anzeichen einer Erkrankung (OLUBUNMI und TAYLOR, 1982). Die Mesenteriallymphknoten der kolostrumfrei-aufgezogenen Ferkel waren vergrößert und bei der histologischen Untersuchung zeigte sich eine geringgradige Zottenatrophie, sowie geringgradige entzündliche Veränderungen im Bereich des Dünndarmes. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Infektion mit C.jej., wobei eine Entzündung des Caecums und des Colons im Vordergrund stand (PRESCOTT et al., 1982; BABAKHANI et al., 1993).

Ferkel, die durch Kaiserschnitt geboren und Kolostrum-frei aufgezogen wurden, stellten durch das Fehlen einer konkurrierenden Darmflora, wegen fehlender maternaler Antikörper und wegen der Ähnlichkeit zum menschlichen Verdauungssystem ein gutes in-vivo-Modell für humane C.-Infektionen dar. Nach Infektion der Ferkel mit einem C.jej.-Stamm zeigten die Tiere schleimigen bis blutigen Durchfall, ähnlich wie dies beim Menschen beschrieben wurde. Pathologische Veränderungen wie Ödem, Hyperämie und Schleimhautdefekte waren vor allem im Bereich des Dickdarmes zu finden (BABAKHANI et al., 1993). Die Anzahl der C.-Kolonien war in einer Studie von WEIJTENS et al. (1993) im Ileuminhalt meistens höher als in den Faeces. Vergleichende Untersuchungen von Dünn- und Dickdarm zeigten, dass C. beide Darmabschnitte gleichermaßen besiedeln konnte (GÖRGEN et al., 1983). Eine Isolierung von C.spp. gelang häufig bei an der porcinen proliferativen Enteropathie erkrankten Schweinen. C. stellte in diesem Fall im Gegensatz zu *Lawsonia intracellularis* aber nicht die Ursache der Erkrankung dar (DAHME und WEISS, 1999).

Im Intestinaltrakt von Schweinen wurden nach BORCH et al. (1996) C. spp. mengenmäßig in größerer Anzahl als *Salmonella* oder *Yersinia* spp. isoliert. OOSTEROM et al. (1985) konnten pro Gramm Darminhalt im Durchschnitt 4000 KBE isolieren. Dabei handelte es sich, wie auch in einer Untersuchung von MANSER und DALZIEL (1985), fast ausschließlich um C.c.. Aus Kotproben gesunder und darmerkrankter Schweine konnten in einer quantitativ-bakteriologischen Untersuchung  $10^2$  bis  $10^5$  Keime pro Gramm Kot isoliert werden, wobei in Proben von

Schweinen, die an einer Enteritis erkrankt waren, keine höheren Keimkonzentrationen festgestellt werden konnten (GÖRGEN et al., 1983). Bis zu vier phänotypisch unterschiedliche C.-Stämme konnten MOORE et al. (2002) aus Schweinelebern isolieren, was ihrer Meinung nach durch mehrfache C.-Infektionen der Schweine zu erklären war. Porcine C.-Stämme waren aber nicht nur in der Lage, Schweine zu infizieren, sondern konnten auch die Blinddärme von Geflügel besiedeln. Eine fehlende Wirtsspezifität ließ die Vermutung zu, dass C.-Stämme zwischen Schweinen und anderen Wild- und Farmtieren übertragbar sein könnten (ZIPRIN et al., 2002b). Ferkel, denen experimentell Ochratoxin A verabreicht wurde, zeigten eine hämorrhagische Diarrhoe, die in Verbindung mit *Serpulina hyodysenteriae* und C.c. gebracht wurde. Die Empfänglichkeit für bakterielle Infektionen nahm laut den Autoren durch die Immuntoxizität des Ochratoxins zu (STOEV et al., 2000). BOTTELDOORN et al. (2001) untersuchten nicht nur Schweine auf C., sondern auch deren Umgebung. Insgesamt wurden in 150 untersuchten Rektumtupferproben aus vier verschiedenen Betrieben 51 C.-positive Ergebnisse festgestellt. Proben aus allen Betrieben waren gleichmäßig betroffen. Auch aus der Umgebung der Tiere konnte in allen Betrieben C. isoliert werden. Die Isolate wurden als C.c. identifiziert. Im Gegensatz zu Salmonellen, bei denen mit Salmonellen kontaminierte Ställe und nicht mit Salmonellen infizierte Schweine vorkamen, waren alle Schweine, die in C.-kontaminierten Ställen lebten, auch mit C. infiziert.

Obwohl aus Schweinekotproben sehr häufig C. isoliert werden konnten, zeigten **Untersuchungen an Schlachttierkörpern** nur eine geringe C.-Kontamination. In Hackfleisch, welches eine höhere Anfälligkeit für Kontaminationen hat, waren C. meist nicht zu finden (BUTZLER und OOSTEROM, 1991). Es konnte beobachtet werden, dass C. auf Schweinehälften durch den Kühlvorgang und dabei vor allem durch den Trocknungseffekt der mechanischen Ventilation beseitigt wurden (OOSTEROM et al., 1983). GILL und BRYANT (1993) berichten von  $10^5$  bis  $10^6$  KBE C. pro Gramm Abfall, der bei der maschinellen Entborstung anfiel. Außerdem wurden nach dem Entborsten auf der Oberfläche von Schlachtschweinen E.coli und C. in einer Größenordnung von  $70 \text{ KBE/cm}^2$  gefunden. Durch das anschließende Abflammen der Tierkörper wurde die Keimzahl in Abhängigkeit von Temperatur und Dauer wieder gesenkt (NERBRINK und BORCH, 1989). WEIJTENS et al. (1993)

hingegen betrachtete Schweine als natürliches Reservoir für C. und somit stellten für ihn Produkte aus Schweinefleisch ein Risiko für den Konsumenten dar.

Das Vorkommen und der Nachweis von C.c. und C.jej. bei Schlachtschweinen in **Österreich** wurde von SCHNÖTZLINGER (1994) untersucht. Dabei wurden 1050 Proben (Kot, Tonsillen, Mesenteriallymphknoten und Gallenflüssigkeit) auf C.c. und C.jej. von insgesamt 300 für tauglich beurteilten Schlachtschweinen aus 42 Betrieben in drei Schlachthöfen in Österreich untersucht. Bei 70,8% der Tiere ließ sich C.c. nachweisen; davon waren 69% im Kot nachweisbar, 27,9% in den Tonsillen und 3,1% in der Gallenflüssigkeit. C.jej. konnte in nur einer einzigen Kotprobe gefunden werden. Ganz im Gegensatz zu den Schlachttierkörpern konnte in Innereien oder an **Organen** wie z.B. in Leber, Niere und Herz häufig C. nachgewiesen werden (SKIRROW, 1991). Eine Untersuchung in **Nordirland** von MOORE und MADDEN (1998) zeigte, dass in 6% der von frisch geschlachteten Schweinen entnommenen **Lebern** C. nachzuweisen war, wobei 50% der C. spp. als C.c. identifiziert werden konnten. Die Gallenblase, sowie die Gallengänge stellten auch nach Untersuchungen von ROSEF (1981) ein wichtiges Reservoir für C. dar. Mit einer Kontamination der Lebern beim Schlachtvorgang und der Fleischuntersuchung durch freiwerdende Gallenflüssigkeit bei der Inzision von Gallengängen, konnte das Vorkommen von C. auf der Oberfläche von Schweinelebern erklärt werden (ROSEF, 1981). KRAMER et al. (2000) isolierten in **Großbritannien** aus Schweinelebern zu 71,7% C.. 34,3% wurden als C.jej. und 42,3% als C.c. identifiziert. Die Autoren waren der Meinung, dass der mikrobielle Status von Schweinelebern von frisch geschlachteten Tieren als Indikator für die Hygienepraxis in Schlachthöfen angesehen werden konnte. Die starke Kontamination der Lebern wurde mit der bei der Eviszeration angewandten Technik erklärt. Hierbei bestand die Gefahr, den Magen-Darmtrakt zu verletzen und somit eine Kontamination der Schlachttierkörper zu verursachen. Einen Anstieg von C. im Intestinaltrakt von Schweinen zum Zeitpunkt des Schlachtens wurde von HARVEY et al. (2001) mit dem Futterentzug und dem Transportstress der Schweine zum Schlachthof in Zusammenhang gebracht.

In Ländern, in denen Schweinefleisch nur gesalzen bzw. nur schwach erhitzt verzehrt wurde, stellte C.c. eine wichtige Ursache klinischer Infektionen dar (SKIRROW, 1991). STICHT-GROH (1982) konnte in einer Untersuchung belegen, dass das in

**Deutschland** praktizierte Waschen und Salzen von Schweinedärmen C. nicht eliminieren konnte.

### II.1.7 Vorkommen von *Campylobacter* bei anderen Tierarten

In Dänemark wurden 1997 in einer umfassenden Untersuchung von NIELSEN et al. folgende Isolierungsraten für thermophile C. im Verdauungstrakt von verschiedenen Tierarten festgestellt: 36% bei Broilern, 47% bei Rindern und 46% bei Schweinen. Isolate von Geflügel und Rind wurden zu 83% bis 91% als C.jej. und beim Schwein zu 95% als C.c. identifiziert. Bei Menschen, die an einer Enteritis litten, wurde in dieser Untersuchung zu 94% C.jej. und zu 6% C.c. festgestellt. C. konnte von ALLSUP und HUNTER (1973) bei an Enteritis erkrankten **Kälbern** häufiger isoliert werden, als bei gesunden Vergleichstieren. Wie diese Erkenntnis zu werten war, konnte damals nicht beurteilt werden. Experimentelle Infektionen zeigten, dass verschiedene C.-Stämme in der Lage waren, eine Enteritis unterschiedlichen Schweregrades zu erzeugen. Die Kälber zeigten frisches bzw. okkultes Blut im Kot, bis hin zu Diarrhoe (FIREHAMMER und MYRES, 1981). AL-MASHAT und TAYLOR (1980 und 1983) infizierten Kälber verschiedener Altersklassen mit C.jej. und mit C.intestinalis. Das klinische Bild mit Fieber und Diarrhoe war bei den mit C.jej. und den mit C.intestinalis infizierten Tieren in ähnlicher Form zu beobachten. Eine milde mukoide, bis manchmal blutige Diarrhoe konnte durch die Verabreichung von C. jej. an gnotobiotische Kälber ausgelöst werden. Histologisch war eine akute Colitis und Enteritis zu erkennen (TERZOLO et al., 1987).

**Lämmer**, die experimentell mit C. infiziert wurden, entwickelten teilweise eine milde mukoide Diarrhoe bzw. schieden blutigen Kot ohne Anzeichen einer Diarrhoe aus. Histologisch waren je nach eingesetztem C.-Stamm gering- bis mittelgradige Veränderungen des Intestinaltraktes zu erkennen (FIREHAMMER und MYERS, 1981; TERZOLO et al., 1987).

**Hunde** schienen Träger von C. zu sein, ohne dabei Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. Unter hyperendemischen Bedingungen zeigten acht Wochen alte Welpen mit einer C.-Infektion spezifische IgG-Antikörper-Spiegel, die sie anscheinend vor einer Erkrankung schützten (NEWTON et al., 1988). Gnotobiotische Hundewelpen

erkrankten im Gegensatz zu konventionell aufgezogenen Welpen nach oraler Infektion mit humanen und caninen C.jej.-Stämmen an Mattigkeit, Inappetenz, milder Diarrhoe mit Tenesmus und geringgradiger Colitis (PRESCOTT und BARKER, 1980). Die klinischen Symptome waren, im Gegensatz zu den Symptomen bei einem mit C.-infizierten Menschen, vergleichsweise milde (BABAKHANI et al., 1993). Bei **Katzen** wurde C. in Zusammenhang mit einer Erkrankung viel seltener isoliert als beim Hund (FOX et al., 1983).

Junge **Nerze** und **Frettchen** erwiesen sich ebenfalls als empfänglich für eine C.-Infektion. Bei einem Ausbruch auf einer kanadischen Nerzfarm zeigten die jungen Tiere Fieber, blutige Diarrhoe, Tenesmus und vereinzelt einen Rectumprolaps. Histologisch war eine Colitis erkennbar, wobei die Erosionen im proximalen Abschnitt des Colons lokalisiert waren. Ältere Tiere waren nicht betroffen. Frettchen schienen ein geeignetes Model für humane Infektionen zu sein, da sie ein dem Menschen sehr ähnliches Erkrankungsbild zeigten (FOX et al., 1987; BELL und MANNING, 1990).

**Nager**, wie z.B. Ratten, Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen, waren selten Träger von C. und zeigten bei einer Kolonisation des Darmes meist keine Krankheitssymptome (SKIRROW, 1994).

Hauptreservoir für C.jej. waren **wildlebende Vögel**, sowie **Zucht- und Nutzgeflügel**. Bei Puten, Enten und Hühnern gelang zu einem hohen Prozentsatz, zum Teil bis zu 100% die Isolierung dieser Bakterienspezies aus dem Darminhalt (WEBER, 1985). Ähnlich wie bei den Nagern, war es beim Geflügel schwieriger, durch experimentelle Infektionen eine Diarrhoe auszulösen (RUIZ-PALACIOS et al., 1981). Geflügel gehörte zu den Tierarten, deren Intestinaltrakt und dabei am stärksten der Blinddarm, der Dickdarm und die Kloake hochgradig mit C. besiedelt war. Die Bakterien waren meist auch im Blut und in der Leber nachweisbar (BEERY et al., 1988). C.jej. konnte laut GIESSEN et al. (1992) und dem RKI (1999) als Kommensale der intestinalen Flora von Broilern betrachtet werden. In Spitzenherden wurde von Infektionsraten von bis zu 90% berichtet. Die Übertragung erfolgte beim Geflügel auf horizontalem und nicht auf vertikalem Wege (SHANE, 1992). Untersuchungen mit Küken zeigten, dass diese in den beiden ersten Lebenswochen frei von einer Besiedelung mit C. waren und eine C.-Infektion erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfand. Auf Geflügelfarmen

waren in einer Untersuchung von NEWELL und WAGENAAR (2000) die meisten Tiere ab einem Lebensalter von drei Wochen zu einem hohen Prozentsatz mit C.jej. infiziert. SCHULZE und ERLER (2002) infizierten zwei und acht Tage alte SPF-Küken oral durch Kropfinstillation mit 11 verschiedenen C.jej.-Isolaten und untersuchten das Kolonisationsvermögen der einzelnen Isolate. Fünf Isolate zeigten eine starke, zwei Isolate eine schwache oder späte und vier Isolate keine nachweisbare Besiedelung des Darmes. Bei Küken, die am zweiten Lebenstag infiziert wurden, konnten die Erreger nach drei Wochen im Caecum nachgewiesen werden. Im Caecum von Küken, die am achten Tag infiziert wurden, konnten die C.jej.-Isolate schon nach zwei Wochen isoliert werden. Auch aus den Lebern der infizierten Tiere konnten die C.-Isolate teilweise rekultiviert werden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigten die infizierten Tiere keinerlei Anzeichen einer Erkrankung oder sonstige Auffälligkeiten. Im Lebergewebe von zuvor infizierten Küken konnten Keimzahlen von  $10^4$ /g Gewebe isoliert werden, ohne dass klinische Veränderungen festgestellt werden konnten (SCHULZE und ERLER, 2002). Junghühner wurden in einer Studie von WILLIS et al. (2002) experimentell mit C.jej. infiziert und in zwei Gruppen aufgestellt. Direkten Kontakt zu ihrem Kot hatten die Tiere, die in Bodenhaltung untergebracht wurden. Keine Möglichkeit mit ihren Ausscheidungen in Kontakt zu kommen, hatten die in Käfigen untergebrachten Hennen. Im Verlauf eines Jahres zeigte sich, dass die Käfigtiere nach acht Monaten C. nicht mehr ausschieden, wohingegen die Tiere in Bodenhaltung weiterhin kulturell C.-positiv waren.

## II.2 Möglichkeiten der Campylobacterdiagnostik

### II.2.1 Kulturelle Nachweismethoden

Es gibt eine große Vielfalt an kulturellen Methoden, um C. aus verschiedenen Materialien zu isolieren. Dazu stehen verschiedene Nährböden mit unterschiedlichen Zusätzen zur Verfügung. C. stellt bei der Anzucht hohe Ansprüche an Nährmedien und Bebrütungsbedingungen. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Untersuchungsmaterialien am Tag der Entnahme angelegt werden oder aber ein spezielles **Transportmedium**, wie z.B. das Cary-Blair-Medium verwendet wird (ROLLE und MAYR, 2002). Wie im OXOID-Handbuch (1993) beschrieben, hat sich die **Anreicherung** in einer Bouillon vor der Beimpfung von Selektivnährböden als

hilfreich erwiesen. Zur **Anreicherung** von *C. spp.* aus Untersuchungsmaterial mit hoher Begleitflora und/oder nur geringer Anzahl an *C.*, eignet sich die Preston-Selektiv-Anreicherungsbouillon. Dabei wird das Untersuchungsmaterial in der Anreicherungsbouillon suspendiert und für 24 Stunden bei 42°C aerob bebrütet. Danach wird der Erreger auf einem *C.*-Selektivnährboden subkultiviert.

Als **Nährböden** können Columbia-A- (Col A), Columbia-B- (Col B), sowie Columbia-Butzler-Agar (CBA) verwendet werden. Die Basisnährböden bestehen jeweils aus Columbia-Agar-Basis. Durch Zusatz von *C.*-Selektiv-Supplement nach SKIRROW (1977) erhält man Col A, durch den Zusatz von Brillantgrünlösung Col B und durch das *C.*-Selektiv-Supplement nach BUTZLER, dessen ursprüngliche Zusammensetzung von LAUWERS et al. (1978) stammt, entsteht CBA. Weitere Basisnährböden (Blutagar-Basen) für die *C.* Diagnostik sind Blutagar-Basis Nr. 2, Brucella-Agar-Basis und *C.*-Agar-Basis (OXOID Handbuch, 1993). Die Bebrütung der beimpften Nährböden erfolgt meist für zwei bis vier Tage bei 37°C und 42°C in einem mikroaerophilen Gasgemisch aus 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> und 85% N<sub>2</sub> (KIST, 1983, OXOID Handbuch, 1993). Die verschiedenen Selektivnährböden unterscheiden sich in ihrer Hemmstoffzusammensetzung. So enthält das SKIRROW-Selektiv-Supplement Polymyxin B, Vancomycin, sowie Trimethoprim. Das Supplement nach BLASER-WANG enthält zusätzlich noch Cephalotin und Amphotericin (SKIRROW, 1977; BLASER et al., 1980). Der Zusatz von Amphotericin B hemmt das Wachstum von Pilzen, Cephalotin steigert die Selektivität des Supplementes. Der Selektivnährboden nach BUTZLER enthält bis auf Cephalotin die gleiche Zusammensetzung wie das Supplement nach SKIRROW, nur wurde Cephalotin durch Cephazolin ersetzt, wodurch *Pseudomonas spp.* stärker gehemmt werden (LAUWERS et al., 1978). Ein weiteres Supplement mit Cefoperazon, Vancomycin und Cycloheximid ist das *C.*-Selektiv-Supplement nach KARMALI et al. (1986). Dieses, ebenso wie der CCDA-Selektivnährboden (Cefoperazon-Charcoal-Deoxycholat-Agar) nach BOLTON et al. (1984), bietet den Vorteil, dass eine Bebrütung von 48 Stunden als ausreichend betrachtet werden kann. Der CCDA-Selektivnährboden enthält Cefoperazon und Amphotericin B.

ATANASSOVA et al. (1998) führten eine vergleichende Untersuchung über kulturelle Methoden zum Nachweis von *C.* durch. Dabei verglichen sie die Methoden I und II

nach ISO 1989 mit einer weiteren, im eigenen Labor modifizierten Methode. Die ISO-Methode I bestand aus einer C.-Selektiv-Anreicherung nach PRESTON. Diese wurde bei 42°C für 48 Stunden mikroaerophil bebrütet. Anschließend wurde ein C.-Selektivagar nach SKIRROW beimpft und für sechs Tage bei 42°C bebrütet. Eine Voranreicherung mit PRESTON-Selektiv-Supplement und C.-Anreicherung-Supplement wurde bei Methode II eingesetzt. Diese wurde zunächst für vier Stunden bei 37°C bebrütet und danach bei 42°C für 44 Stunden weiterbebrütet. Als Nährboden wurde Agar nach SKIRROW und PRESTON verwendet. Diese wurden bei 42°C für 24 Stunden mikroaerophil bebrütet. Die laboreigene Untersuchungsmethode bestand in der Verwendung von PRESTON-Selektiv-Anreicherungsbouillon Nr. 2, welche für 24 Stunden bei 42°C bebrütet wurde. Ausgestrichen wurde die Bouillon anschließend auf CCDA-Selektiv-Agar, welcher zunächst bei 37°C und danach bei 42°C, jeweils für 24 Stunden bebrütet wurde. Die laboreigene Methode erbrachte in dieser Untersuchung die besten Isolierungsergebnisse.

### **II.2.2 Biochemische Differenzierung**

Die biochemische Differenzierung ermöglicht die Abgrenzung von thermophilen zu nicht thermophilen C.-Isolaten, bzw. zu den C.-Deckseuchenerregern.

In **Tabelle 5** sind Merkmale verschiedener C.-Stämme nach BISPING und AMTSBERG (1988) und KÖTSCHE (1993) zur Differenzierung und kulturellen Isolierung von *Campylobacter* dargestellt.

**Tabelle 5      Kulturelle und biochemische Differenzierung von *Campylobacter***  
**(nach BISPING und AMTSBERG,1988 und KÖTSCHKE, 1993)**

	<i>C. fet.ssp. ven.</i>	<i>C. fet.ssp. fet.</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. laridis</i>
Katalase	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S <sup>1</sup>	-	v	v	v	-
H <sub>2</sub> S <sup>2</sup>	v	+	+	+	v
3,5% NaCl	-	v	-	-	-
1% Glyzin	v	+	+	+	+
0,1% Selenit	-	+	+	+	+
Hippurat	-	-	+	-	-
25°C	+	+	-	-	-
42°C-43°C	-	-	+	+	+

<sup>1</sup> unempfindlicher Test, Nachweis in Leberbouillon mit eingehängtem Bleiacetatstreifen oder in Agar nach Kligler

<sup>2</sup> empfindlicher Test, Nachweis in Nährbouillon mit 0,025% Cystein mit eingehängtem Bleiacetatstreifen

v variabel

Des weiteren gibt es ein industriell gefertigtes Identifizierungssystem für *C.*, den Api Campy (bioMérieux). Hierbei wird durch standardisierte Tests und eine spezifische Datenbasis eine Identifizierung von *C.* ermöglicht.

### II.2.3      Moderne Antigen-Nachweismethoden

Für den Nachweis von *C.*-Antigen in Kotproben stehen mehrere Antigen-ELISAs zur Verfügung. Eine molekularbiologische Methode, um *C.* nachzuweisen, besteht in der PCR (polymerase chain reaction) durch den Nachweis von Nucleinsäuren. Mit dieser Methode ist eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Spezies zu treffen und sie basiert auf der Amplifikation von Flagellin- bzw. ribosomalen Genabschnitten. Dabei existiert eine große Vielfalt an Modifikationen bei der jeweiligen Durchführung der PCR's (WASSENAAR, 2000). Des weiteren besteht die Möglichkeit durch Southernblots eine Spezifizierung zu erreichen. Die PCR stellt eine schnelle, sensitive und spezifische Methode dar, um in Kotproben und tierischen Lebensmitteln *C.c.*- und

C.jej.-Stämme nachzuweisen (BOLTON et al., 2002; CLOAK und FRATAMICO, 2002). Durch die Durchführung einer Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) besteht die Möglichkeit der Feintypisierung (CLOAK und FRATAMICO, 2002). Dies dient vor allem der Sicherung von Infektketten und wird deshalb nicht routinemäßig durchgeführt. Bei C.-Ausbrüchen kann es notwendig werden, dass in Speziallaboratorien ein Flagellin-RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) oder ein AFLP (Fragmentlängenpolymorphismus nach Amplifikation) durchgeführt wird (RKI,1999).

### **II.2.4 Methoden des Antikörpernachweises**

#### **II.2.4.1 Campylobacter-Antikörper-Diagnostik in der Humanmedizin**

Der C.-Antikörper-Nachweis ist in der Humanmedizin möglich, doch wird er routinemäßig in den humanmedizinischen Labors nicht durchgeführt (RKI,1999). Zur Bestimmung von C.-Antikörpern in Seren stehen in der Humanmedizin eine ganze Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung. Neben Nachweisverfahren wie die Komplementbindungsreaktion (PALMER und WHALEY, 1986; JANVIER et al., 2000) oder ein Diffusion-in-Gel ELISA (SVEDHEM et al., 1983), werden vor allem ELISAs eingesetzt (BLASER und DUNCAN, 1984; HERBRINK et al., 1988). Die meisten diagnostischen Verfahren, die in der **Humanmedizin** zur serologischen Antikörpererkennung genutzt werden, verwenden proteinreiche Antigene, um Antikörper nachzuweisen. Diese Antigene weisen Antikörper nach, die nicht gegen einzelne Serotypen, sondern allgemein gegen C. gerichtet sind (NACHAMKIN et al.,1998). Ein kommerziell erhältlicher Test um C.-Antikörper zu bestimmen, basiert auf einer Komplementbindungsreaktion, die eine Antigenpräparation beinhaltet, welche aus 5 C.jej.-Stämmen besteht. Dieser Test zeigt eine gute Spezifität, ist aber zeitraubend, schwierig durchzuführen und zeigt keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen C.jej. und C.c.. Der Test unterscheidet nicht zwischen IgG und IgM; die meisten Antikörper, die nachgewiesen werden, sind aus der IgM-Klasse. Somit eignet sich dieser Test vor allem für die Diagnose von akuten Erkrankungen (JANVIER et al., 2000). Durch eine von JANVIER et al. (2000) eingesetzte Western-blot-Technik lassen sich vor allem IgG nachweisen, womit sich dieser Test für die Diagnose einer etwas länger zurückliegenden Infektion und dadurch für epidemiologische

Erhebungen eignet (JANVIER et al., 2000). Ein von SVEDHEM et al. (1983) verwendeter Diffusion-in-Gel ELISA zeigte bei der Untersuchung auf Antikörper gegen C.jej. eine hohe Spezifität, Verlässlichkeit, Sensitivität und Kapazität. Er war einfach in der Anwendung und man benötigte keine teure Ausstattung. IgG und IgM Antikörper konnten dabei separat erfasst werden. Als Beispiel für einen C.-Antikörper ELISA im Bereich der Humanmedizin, wird ein von CAWTHRAW et al. (2000) entwickelter ELISA beschrieben. Seren von im Geflügelschlachthof arbeitenden Menschen wurden auf C.-Antikörper untersucht. Als Antigen fanden Oberflächenproteine von in der Region isolierten C.-Stämmen Verwendung.

### **II.2.4.2 Campylobacter-Antikörper-Diagnostik in der Tiermedizin**

#### **Diagnostik beim Schwein**

Über einen ELISA zur Bestimmung von porcinen C.-Antikörpern in Fleischsaft wurde von KRAMER et al. (2001) berichtet. Als Antigen fanden eine Kombination aus Lipopolysacchariden von zwei verschiedenen C.c.- und C.jej.-Stämmen Verwendung. 500 Fleischsaftproben zeigten unterschiedliche Antikörperspiegel, wobei auf IgG, IgM und IgA untersucht wurde. Die Autoren berichten, dass der Nachweis der Immunglobuline mit ihrem entwickelten ELISA spezifisch und sensitiv sei. Nähere Beschreibungen der Methode und Ergebnisse wurden aber noch nicht veröffentlicht (Stand Januar 2003).

#### **Diagnostik beim Geflügel**

In der Tiermedizin wurden auf dem Geflügelsektor verschiedene ELISA's zur Bestimmung von Antikörpern entwickelt. Ein von SAHIN et al. (2001) entwickelter ELISA setzte Komponenten der äußeren Membran als Antigen für die Beschichtung ein. Der cut-off Wert für positive Proben wurde bestimmt indem drei Standardabweichungen zum Mittelwert der negativen Kontrollen addiert wurden. Negative Kontrollen setzten sich aus Proben von SPF-Tieren und Proben von C.-negativen Broilern zusammen. Als Positivkontrollen wurden Proben von C.-infizierten Elterntieren mit einem OD-Wert von 1,5 und höher eingesetzt.

HAAS et al. (1999) entwickelten einen ELISA zur Antikörperbestimmung bei zuvor oral oder subkutan, mit C.jej. infiziertem Geflügel. SPF-Tiere wurden über den Kropf mit verschiedenen C.-Serotypen infiziert und alle drei bis sechs Tage während der ersten fünf Wochen und einmal in der sechsten Woche post infectionem einer Blutabnahme unterzogen. Wie sich zeigte, konnte dieser ELISA zur Bestimmung von Antikörpern bei Geflügel bis zu einem Alter von 10 Wochen eingesetzt werden. Dann nahm die unspezifische Immunreaktion mit dem Alter des Geflügels zu. Bei dieser Untersuchung konnten in nahezu jedem Serum spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dies wies darauf hin, dass vorausgegangene Infektionen eine spezifische Immunreaktion ausgelöst hatten (HAAS et al., 1999). Von WIDDERS et al. (1996) wurde ebenfalls ein ELISA zur Bestimmung von C.-Antikörpern beim Geflügel beschrieben. Des Weiteren wurde von WIDDERS et al. (1998) ein Western-blot vorgestellt, mit dessen Hilfe eine Bestimmung der Spezifität von C.-Antikörpern und von intestinalen Sekreten durchgeführt werden konnte. Ein weiterer ELISA zur Bestimmung von C.-Antikörpern im Geflügelbereich wurde von SCHULZE und ERLER (2002) eingesetzt. Als Antigen für die Beschichtung wurden Proteinantigene als Glycin-Extrakte in PBS-Puffer verwendet. Seren von kulturell C.jej.-positiven Legehennen wurden als Positivkontrolle gepoolt und Seren von Küken bis zu einem Alter von vier Wochen als Negativkontrolle herangezogen.

## **II.3 Derzeitige rechtliche Handhabung**

### **II.3.1 Humanmedizinische Vorschriften**

#### **Infektionsschutzgesetz (IfSG)**

Nach § 7 besteht bei indirektem oder direktem Nachweis einer darmpathogenen *Campylobacter* spp. namentliche Meldepflicht, soweit die Nachweise auf eine akute Infektion hinweisen.

Gemäß § 6 IfSG sind Krankheitsverdacht und Erkrankung meldepflichtig, wenn die entsprechende Person eine Tätigkeit nach § 42 IfSG ausübt (Herstellen, Behandeln oder Inverkehrbringen von in Absatz 2 genannten Lebensmitteln, wenn sie mit diesen in Berührung kommen oder in Küchen von Gaststätten oder sonstigen Einrichtungen tätig sind).

### **II.3.2 Tiermedizinische Vorschriften in Europa**

Tierseuchenverordnung der **Schweiz** (Stand vom 28. Dezember 2001)

Art. 5 zu überwachende Seuchen:

Als zu überwachende Seuchen gilt unter anderem die *Campylobacteriose*.

#### **Geltendes Gemeinschaftsrecht, Dokument 301D0029**

2001/29/EG: Entscheidung der Kommission vom 27. Dezember 2000 über eine besondere Finanzhilfe der Gemeinschaft für ein Programm zur Überwachung von *Campylobacter*-Erregern bei Masthähnchen und Hühnern, vorgelegt von Schweden.

„In der Schlussfolgerung zu seinem Gutachten vom 12. April 2000 bezeichnete der wissenschaftliche Ausschuss „Veterinärmaßnahmen im Zusammenhang mit der öffentlichen Gesundheit“ *Salmonella*- und *Campylobacter*- Erreger als die derzeit wichtigsten lebensmittelbedingten Zoonosen, wenn man von der Zahl der festgestellten Infektionen beim Menschen ausgeht.“ Mit dem

Überwachungsprogramm für Masthähnchen und Hühner gelang es, die Prävalenz von Campylobacter-Erregern bei geschlachteten Tieren zu reduzieren.

„Das Programm liefert technische und wissenschaftliche Informationen, die für das gemeinschaftliche Veterinärrecht von großer Wichtigkeit sein dürften.“

### **II.3.3 Vorschläge für Rechtsakte**

#### **Kommissionsvorschläge, Dokument 599PC0004**

Vorschlag für eine Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinie 92/117/EWG über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierische Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen (1999).

„Im Hinblick auf die Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Durchführbarkeit gezielter Bekämpfungsmaßnahmen im landwirtschaftlichen Betrieb sollten Bakterien wie Campylobacter und cytotoxische E.coli ins Auge gefasst werden.“

#### **Dokument 32001DO232**

2001/232/EG: Entscheidung der Kommission vom 13.März 2001 über den Entwurf einer Verordnung des Königreichs der Niederlande über die Etikettierung von Geflügelfleisch (Amtsblatt Nr. 1084 vom 23/03/2001, S. 0057-0058).

Verordnungsentwurf mit besonderen Vorschriften für die Etikettierung, die unter bestimmten Bedingungen für Geflügel gelten, das in den Niederlanden im Einzelhandel verkauft wird. Gemäß dieses Verordnungsentwurfes darf Geflügelfleisch, bei dem Salmonellen oder C. jejuni in 25 Gramm nachweisbar sind, nur verpackt ausgestellt, dem Verbraucher zum Verkauf angeboten, verkauft und geliefert werden, wobei es mit einem Etikett versehen sein muss, das folgende Aufschrift trägt: „Achtung, dieses Produkt enthält krankheitserregende Bakterien. Achten Sie darauf, dass diese Bakterien nicht durch die Verpackung, Ihre Hände oder Küchengeräte in Ihr Essen gelangen. Das Fleisch muss gründlich gegart werden, um die Bakterien abzutöten.“

### **II.3.4 Fleischhygienerechtliche Vorschriften**

Schweiz: Beurteilung nach den allgemeinen Kriterien (FUV, Anhang 3).

Campylobacter jejuni und Campylobacter coli dürfen in nicht genussfertigen Lebensmitteln den Grenzwert von  $10^5$  koloniebildenden Einheiten nicht überschreiten und in genussfertigen Lebensmitteln den Grenzwert von  $10^4$  koloniebildenden Einheiten pro Gramm nicht überschreiten.

(Hygieneverordnung vom 26.Juni 1995; SR 817.051).

Deutschland : FIHV, Anlage 1, Kapitel 1

5a. Die Schlachterlaubnis kann versagt werden, wenn bei dem untersuchten Tier eine andere auf Mensch oder Tier übertragbare Krankheit als die in Nummer 5.1 genannten festgestellt worden ist, oder der Verdacht auf eine solche Krankheit vorliegt.

### **II.3.5 Lebensmittelrechtliche Vorschriften**

LMBG §8 Verbote zum Schutz der Gesundheit

„Es ist verboten,

1. LM für andere derart herzustellen oder zu behandeln, dass ihr Verzehr geeignet ist, die Gesundheit zu schädigen.“

### III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### III.1 Material und Geräte

##### III.1.1 Impfschweine

Auf der Versuchsstation für Tierhaltung der Universität Hohenheim am Unteren Lindenhof in Eningen wurden **sechs Schweine** zur Gewinnung von C.- Antikörpern zur Verfügung gestellt. Die Schweine der Rasse DL (Deutsche Landrasse) wurden mit einem Alter von ca. 10 Wochen separat in einer Außenbucht aufgestellt und durch Ohrmarken gekennzeichnet. Über einen Zeitraum von vier Monaten wurden die Tiere mehrmals mit zwei selbst hergestellten unterschiedlichen C.-Vakzinen immunisiert (**Tabellen 6 und 7**) und der Verlauf der Immunisierung zeitgleich mittels Antikörperbestimmung kontrolliert.

##### III.1.2 Kulturmedien für die Anzucht von *Campylobacter*

In Klammern ein Beispiel eines Herstellers oder einer Bezugsquelle.

###### III.1.2.1 Halbfestes Nährmedium

**Flüssiges Thioglycolat Medium** ( DIFCO Nr. 0256-17-2) pH 7,1 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Bacto Casein	15,00
Bacto Hefeextrakt	5,00
Bacto D(+)-Glucose	5,50
Natriumchlorid	2,50
L(+)-Cystein	0,50
Natriumthioglycolat	0,50
Bacto Agar	0,75
Resazurin	0,001

### III.1.2.2 Feste Nährmedien

#### Columbia A-Agar (COL-A)

Columbia-Agar-Basis (OXOID, Nr. CM 331) pH 7,3 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0

+ Campylobacter-Selektiv-Supplement (Skirrow) (OXOID, Nr. SR 069)

	<b>Menge/l</b>
Vancomycin	10,0 mg
Polymyxin B	2 500 IE
Trimethoprim	5,0 mg

+ Steriles defibriniertes Blut (HAEMOVET- MESE)

	<b>ml/l</b>
Steriles defibriniertes Blut	50,0

#### Columbia B-Agar (COL-B)

Columbia-Agar-Basis (OXOID, Nr. CM 331) pH 7,3 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0

## Material

---

+ 1%ige Brillantgrünlösung (MERCK, Nr. 101310)

	<b>ml/l</b>
1%ige Brillantgrünlösung	0,87

+ Steriles defibriniertes Blut (HAEMOVET-MESE)

	<b>ml/l</b>
Steriles defibriniertes Blut	50,0

### **Columbia-Butzler-Agar (CBA)**

Columbia-Agar-Basis (OXOID, Nr. CM 331) pH 7,3 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Spezialpepton	23,0
Stärke	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	10,0

+ Campylobacter-Selektiv-Supplement (Butzler) (OXOID, Nr. SR085)

	<b>Menge/l</b>
Bacitracin	15 000 IE
Cycloheximid	25 mg
Colistin	10 000 IE
Cephazolin	7,50 mg
Novobiocin	2,50 mg

+ Steriles defibriniertes Blut (HAEMOVET-MESE)

	<b>ml/l</b>
Steriles defibriniertes Blut	50,0

**Karmali-Selektivnährboden, blutfrei**

Campylobacter-Agar-Basis nach Karmali, blutfrei (OXOID, Nr. CM 908) pH 7,4 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Columbia-Agar-Basis	39,0
Aktivkohle	4,0

+ Campylobacter-Selektiv-Supplement (Karmali) (OXOID, Nr. SR 139)

	<b>mg/l</b>
Hämin	32,0
Natriumpyruvat	100,0
Cefoperazon	32,0
Vancomycin	20,0
Cycloheximid	100,0

**Blutagar**, pH 7,3 ± 0,2

Gewöhnlicher Agar 2%ig mit 0,1% Glucose, pH 7,4 ± 0,2

	<b>g/l</b>
Fleischextrakt (MERCK, Nr. 103979)	5,0
Hefeextrakt (MERCK, Nr. 103753)	3,0
Natriumchlorid (MERCK, Nr. 106400)	3,0
Natriumhydrogenphosphat (MERCK, Nr. 106580)	2,0
Beco- Agar (WBCO, Nr. E406)	17,14
Pepton aus Casein tryptisch verdaut (MERCK, Nr. 107213)	10,0
Glucose (MERCK, Nr. 108342)	1,0

+ Steriles defibriniertes Blut (HAEMOVET-MESE)

	<b>ml/l</b>
Steriles defibriniertes Blut	100,0

**Gassner-Agar**, pH 6,5- 6,6

Basisnährboden:

	<b>g/l</b>
Fleischextrakt (MERCK, Nr. 103979)	5,0
Hefeextrakt (MERCK, Nr. 103753)	3,0
Natriumchlorid (MERCK, Nr. 106400)	5,0
Pepton aus Casein tryptisch verdaut (MERCK, Nr. 107213)	10,0
Beco- Agar (WBCO, Nr. E406)	17,14
Laktose (MERCK, 107657)	50,0

+ Zusatz von:

	<b>ml/l</b>
Metachromgelblösung 2%ig (CHROMA, Nr. 1A438)	25,0
Wasserblaulösung 1%ig (CHROMA, Nr. 1B 529 6B extra P)	62,5

**III.1.3 Biologische Materialien**

**Bakterien:**

- Campylobacter coli DSM 4689
- Campylobacter jejuni CCUG 10935
- Campylobacter lari DSM 11375
- Campylobacter coli-Feldstamm B 243
- Campylobacter fetus ssp. venerealis Referenzstamm TiH Hannover PB242/01 (92)
- Campylobacter fetus ssp. fetus, Feldstamm Jena F 286
- E. coli DSM 1103

**Seren:**

- C.-Hyperimmunseren von sechs Impfschweinen (III.2.7)
- Schweine-Feldseren (n= 408) aus Einsendungen, die zur serologischen Untersuchung auf Morbus Aujeszky, PRRS und Salmonellen an das STUA Aulendorf eingeschickt wurden.

**Fleischsaft:**

- Schweine-Fleischsaftproben (n= 302) aus Einsendungen, die zur serologischen Untersuchung auf Salmonellen-Antikörper an das STUA Aulendorf eingeschickt wurden.

An Material und Geräten wurde die in einem gehobenen mikrobiologischen und serologischen Labor vorhandene Ausstattung genutzt.

**III.1.4 Material und Geräte für die Anzucht und Identifizierung von Campylobacter**

- Begasungsbrutschrank 37°C, TYP 91400013, Gasgemisch CO<sub>2</sub> 15%, O<sub>2</sub> 4,5% , N<sub>2</sub> 80,5% (Binder)
- Begasungsbrutschrank 42°C, TYP 91400013, Gasgemisch CO<sub>2</sub> 15%, O<sub>2</sub> 4,5% , N<sub>2</sub> 80,5% (Binder)
- Brutschrank 37°C (HERAEUS, B 6420)
- Anaerobiertopf, ohne Katalysator (OXOID, Nr. HP0031A)
- Mikroskop, Axioskop (ZEISS)
- Gas Generating Kit (OXOID, Nr. BR038B)
- Mikrobank (MAST DIAGNOSTIKA, Nr.291609)
- McFarland Standard (BIO MÉRIEUX, Nr.70900)

## **Reagenzien für die Identifizierung von Campylobacter**

- Api Campy (BIO MERIEUX, Nr. 20800)

### Im Testsystem enthaltenes Material:

- Streifen mit Mikroröhrchen
- Ampullen NaCl 0,85%iges Medium (3ml)
- Ampullen AUX Medium
- Ampulle McFarland Nr. 6
- Inkubationswannen
- Ergebnisblätter
- Arbeitsanleitung

### Zusätzlich benötigte Reagenzien:

- NIT 1 (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 440)
- NIT 2 (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 450)
- FB (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 560)
- NIN (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 490)
- OX (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 460)
- Paraffinöl (BIO MÉRIEUX, Nr. 70 100)

### **III.1.5 Material und Geräte für die Antigenherstellung**

- Zentrifuge Rotixa P 4201 (HETTICH, Seriennr. 4051)
- Tischzentrifuge Mikrofuge 20 (HETTICH, Seriennr. 953)
- Zentrifugenglas 250 ml (VWR, Nr. 525K1114)
- Zentrifugenglas 80 ml (VWR, Nr. 525K1110)
- Schüttler, Minishaker MS 1 (IKA)
- Hand- Homogenisator (VWR, 432B1215)
- Pistille für Homogenisator (VWR, 432B1250)
- Branson Ultraschall-Desintegrator Sonifier „ B-12“ (HEINEMANN)
- Eismaschine Typ AF 10 ASB0600 (SCOTSMAN)
- Spezialphotometer (ZEISS, PMQ 2/M 4Q3)
- PP-Röhrchen, 50 ml (GREINER BIO-ONE, Nr. 210261)

### **III.1.6 Reagenzien und Laborbedarf für die Impfstoffherstellung, Immunisierung und Probengewinnung**

- Inkomplettes Freundsches Adjuvans (SIGMA-ALDRICH; Nr. F5506)
- Zentrifuge, 8 Gehänge (STOCK, Seriennr. 2421)
- Zentrifugenglas 250 ml (VWR, Nr. 525K1114)
- Formaldehydlösung mind. 35% (MERCK, Nr. 104001)
- Schüttler, Minishaker MS 1 (IKA)
- Hand-Homogenisator (VWR, Nr. 432B1215)
- Pistille für Homogenisator (VWR, Nr. 432B1250)
- Einweg-Kanülen, 1,8 x 43 mm (STRAUSS)
- Einweg-Kanüle, 20G x 2", 0,9 x 50 mm (TERUMO)
- Einwegspritzen, 10 ml (HENKE SASS WOLF)
- Blutröhrchen 10 ml (SARSTEDT, Nr. 26.323.037)
- Vacuette® 9ml (GREINER BIO-ONE, Nr. 455001)
- Weithalsfässer, 15,4 Liter (ROTH, Nr. 0789.1)
- Stuhl Röhrchen (SARSTEDT, Nr. 80.734.001)
- Anschneidemesser mit Kunststoffgriff (GIESSER)
- Fleischsaft Röhrchen (SARSTEDT)
- Deep-well-Platten 1,2 ml (ABGENE, Nr. AB-0564)
- Deep-well-Platten 2,2 ml (ABGENE, Nr. AB-0661)
- Verschlussmatten für Deep-well 1,2 ml (ABGENE, Nr. AB-0574)
- Verschlussmatten für Deep-well 2,2 ml (ABGENE, Nr. AB-0675)
- Weithals Zentrifugenflasche (VWR, Nr. 5252361)

### **III.1.7 Material und Geräte zur Proteinbestimmung der Antigensuspension**

#### Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951)

- Spezialphotometer (ZEISS, PMQ 2/M 4Q3)
- Schüttler, Minishaker MS 1 (IKA)
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (MERCK; 109001)
- Natriumcarbonat, wasserfrei Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (MERCK, Nr. 106398)

- Natriumhydroxid, NaOH (MERCK, Nr. 106498)
- Kupfersulfat-Pentahydrat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (MERCK, Nr. 102790)
- Kaliumtartrat (RIEDEL DE HAËN, Nr. 25510)
- BSA Rinderserumalbumin, Fraktion V (MERCK, Nr. 112018)

### Eiweißbestimmung mit Merckotest®

- Gesamteiweiß Merckotest® (MERCK, NR. 103327)

### Im Testsystem enthaltene Reagenzien:

- Biuret-Reagenz (Konzentrat)
- Vergleichsreagenz (Konzentrat)
- Standardlösung (6g/100 ml)

## **III.1.8 Material und Geräte für die Entwicklung und Durchführung des ELISA' s**

### **III.1.8.1 Geräte**

- Waage TYP 824-32 (KERN)
- Schüttler, Minishaker MS 1 (IKA)
- Schüttler, Titramax 100 (HEIDOLPH)
- Kreisschüttler, KS 250 (IKA)
- Magnetrührer Combimag ( IKA, Seriennr. 35399)
- Magnetrührstäbchen (BRAND, Nr.137120)
- pH-Meter, TYP 537 (WTW)
- Waschkamm, Immuno Washer 12 (NUNC, Nr. 470175)
- Schlauchsatz für Nunc- Immuno Wash (NUNC, Nr. 554569)
- Pipettierautomat, Tecan "Genesis" Serie (SLT)
- ELISA-Reader , Spektra Classic III (Tecan / SLT) mit Software Easy-Fit Version 7.01 (SLT)

### Pipetten

- 0,5-10 µl Reference®, variabel (EPPENDORF, Nr. 4910000.018)
- 10-100 µl Research®, variabel (EPPENDORF, Nr. 3111000.041)
- 20-200 µl Research®, variabel (EPPENDORF, Nr. 3111000.050)
- 100-1000 µl Research®, variabel (EPPENDORF, Nr. 3111000.068)

### Multikanalpipette

- 30-300 µl Research®, 8-Kanal (EPPENDORF, Nr. 3114000.050)
- 50-1200 µl Research® pro, 8-Kanal (EPPENDORF, Nr. 4860000.577)

### Manueller Handdispenser

- Multipette® plus 4981 (EPPENDORF, Nr. 4981000.019)
- Pipettierhilfe Pipetus (ROTH, Nr. N 472.1)
- Multibox mit Schiebedeckel (ROTH; Nr.2681.1)
- Wechseleinsätze für Multibox 1-200µl (ROTH; Nr.H609.1)
- Wechseleinsätze für Multibox 1000µl (ROTH; Nr. H610.1)

### III.1.8.2 Gebrauchsmaterialien

- F 96 POLYSORP™ NUNC-IMMUNO™ Plate (NUNC, Nr. 475094)
- Mikrotiterplatten, 8 x 12 Cups aus PP (NEOLAB, Nr. 107-9706)
- PP-Röhrchen, 50 ml (GREINER BIO-ONE, Nr. 210261)
- Reaktionsgefäße 2 ml, Safe-Lock (EPPENDORF, Nr. 0030120.094)
- Pasteurpipetten 145 mm (BRAND, Nr. 747715)
- Gummihütchen für Pasteurpipetten (BRAND, Nr. 124700)
- Einwegpipetten 10 ml (TPP, Nr. 94010)
- Einwegpipetten 5 ml (TPP, Nr. 94005)
- Reagenzreservoir (BRAND, Nr.703459)
- Abdeckfolien für Mikrotiterplatten (ROTH, Nr. H769.1)
- Zellstoff

#### Pipettenspitzen

- Pipettenspitzen Standartips 20 µl (EPPENDORF, Nr. 0030001.168)
- Pipettenspitzen Standartips 100 µl (EPPENDORF, Nr. 0030003.004)
- Pipettenspitzen Standartips 300 µl (EPPENDORF, Nr. 0030001.486)
- Pipettenspitzen Standartips 1 000 µl (EPPENDORF, Nr. 0030015.002)
- Pipettenspitzen Standartips 1,25 ml (EPPENDORF, Nr. 0030058.615)
- Combitips® plus 5ml (EPPENDORF, Nr. 0030069.250)

#### III.1.8.3 Reagenzien für ELISA

- Natriumchlorid NaCl (MERCK, Nr. 106400)
- Kaliumchlorid KCl (MERCK, Nr. 104936)
- di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (MERCK, Nr. 106580)
- Kaliumhydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (MERCK, Nr. 104873)
- Natriumcarbonat, wasserfrei  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (MERCK, Nr. 106398)
- Natriumhydrogencarbonat,  $\text{NaHCO}_3$  (RIEDEL DE HAËN, Nr. 31437)
- Salzsäure HCl (MERCK, Nr. 109970)
- Natriumhydroxid NaOH (MERCK, Nr. 106498)
- Schwefelsäure 96%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (MERCK, Nr. 100731)
- Magermilch (DIFCO, Nr. 232100)
- 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin, TMB, gebrauchsfertig (SIGMA- ALDRICH, Nr. T 8665)
- Konjugat: Ziege- anti- Schwein IgG (H+L)-Peroxidase (DIANOVA, Nr. 114-035-003)
- Tween® 20 Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (ROTH; Nr. 9127.1)
- BSA Rinderserumalbumin, Fraktion V (MERCK, Nr. 112018)

### III.1.9 Herstellung der Gebrauchslösungen für den ELISA

#### Carbonatpuffer

Es wurden zwei Stammlösungen angesetzt, aus denen die Gebrauchslösung hergestellt wurde.

Stammlösung A: 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$   
2,86 g ad 50 ml A. dest.

Stammlösung B: 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$   
0,84 g ad 50 ml A. dest.

Gebrauchslösung, pH-Wert 9,5-10: 3,25 ml Stammlösung A  
+ 9,25 ml Stammlösung B  
+ 37,5 ml A. dest.

#### PBS- Lösung

	<u>10-fach</u>
NaCl	80 g
KCL	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat)	14,4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Kaliumhydrogenphosphat)	2 g
A. dest.	ad 1 000 ml.

Je nach Wasserqualität muss der pH- Wert noch durch Zugabe von Salzsäure oder Natriumhydroxid auf 7,2 eingestellt werden.

### **Waschlösung (PBS / Tween)**

Für 1 000 ml (PBS, 1-fach) werden 100 ml PBS 10-fach + 900 ml A. dest.  
+0,5ml Tween® 20 ( $\cong$  0,05%) verwendet.

### **Blockpuffer (MMP)**

500 ml PBS + 25 gr Magermilchpulver ( $\cong$  5%)

### **Verdünnungspuffer für Proben und Konjugat**

500 ml Waschlösung (PBS Tween®) + 25 gr Magermilchpulver ( $\cong$  5%)

### **Puffer mit Bovinem Serumalbumin**

100 ml PBS + 3 gr bovines Serumalbumin ( $\cong$  3%)

Diese Lösung wurde als Waschpuffer sowie zur Verdünnung der Seren und des Konjugates eingesetzt.

### **Konjugat**

Ziege- Anti- Schwein- Meerrettichperoxidase- Konjugat IgG (H+L) in Puffer mit Bovinem Serum Albumin als Proteinstabilisator, konserviert mit Thimerosal.  
Verdünnung des Konjugates in Magermilchpuffer mit Tween® 20.

### **Substrat**

TMB-Substratlösung, 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin

### **Stopplösung**

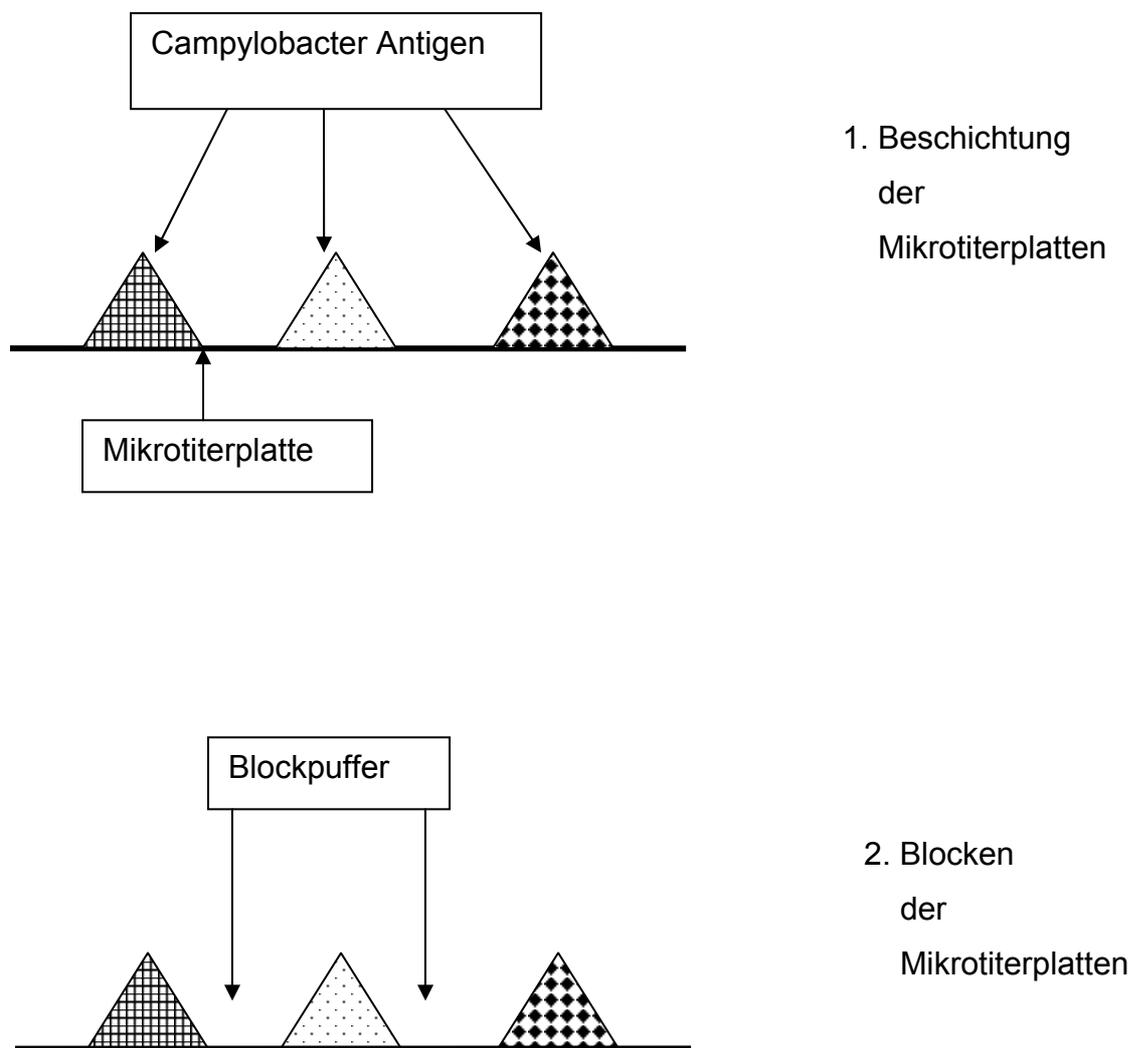
1 N Schwefelsäure H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### III.2 Methoden

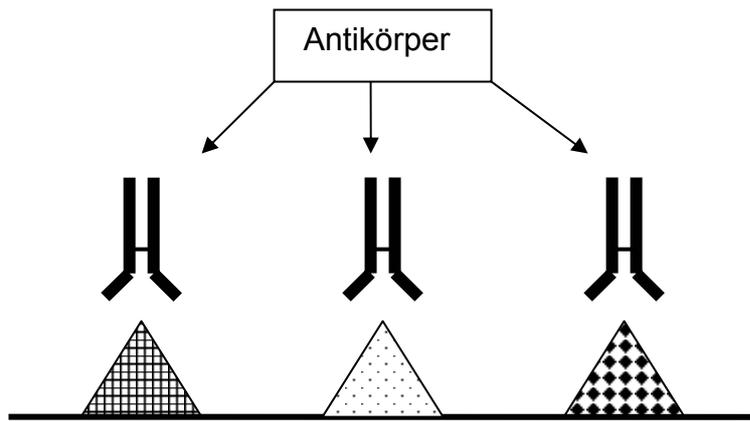
#### III.2.1 Indirekter ELISA

Das Prinzip des ausgewählten Verfahrens (indirekter ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen *Campylobacter* (C.) wird in **Abbildung 2** schematisch dargestellt

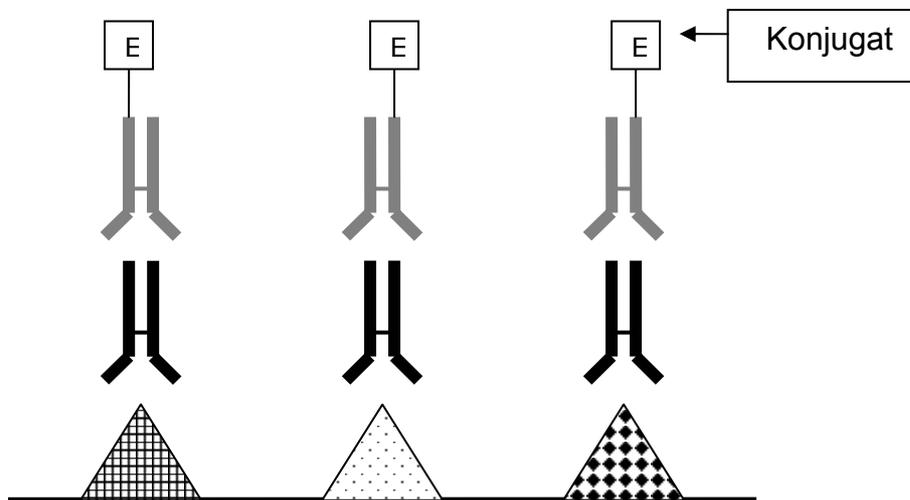
**Abbildung 2 Schematische Darstellung des indirekten ELISAs**



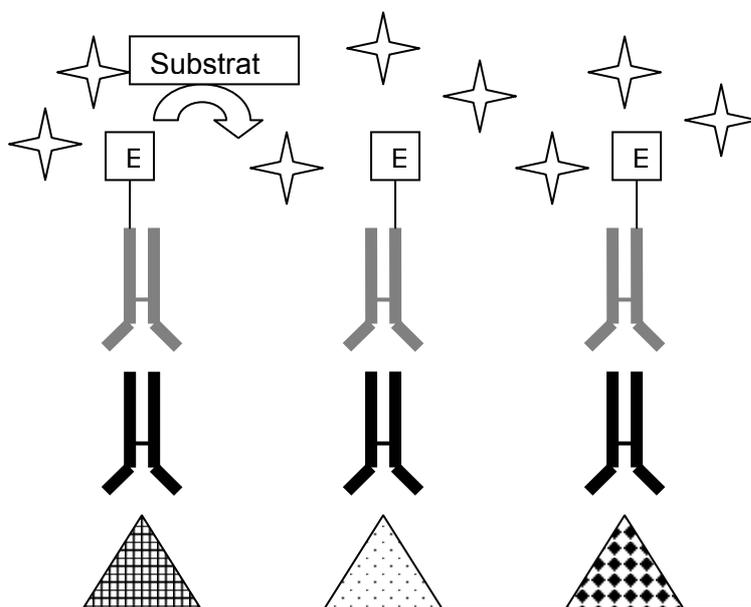
Fortsetzung Abbildung 2



3. Bindung  
von  
Probenantikörpern



4. Bindung von  
enzymmarkierten  
Antikörpern



5. Umsetzung  
des  
Substrates

### III.2.2 Für die Antigenherstellung verwendete Campylobacterstämme

Folgende thermophile Campylobacterstämme aus der Stammsammlung des STUA Aulendorf wurden eingesetzt:

- *C. coli* DSM 4689
- *C. jejuni jejuni* DSM 4688
- *C. jejuni* CCUG 10935
- *C. lari* DSM 11375

Zusätzlich wurde ein *C.coli*-Feldstamm

- B 243 verwendet, der

aus einem Rektaltupfer eines ca. drei Wochen alten Ferkels isoliert worden war. Der Keim war mittels API Campy zu 99,9% als *C. coli* identifiziert worden.

Für Vergleichsuntersuchungen wurden die beiden Deckseuchenerreger

- *C. fetus ssp. venerealis* Referenzstamm TiH Hannover PB 242/01 (92)
- *C. fetus ssp. fetus* Feldstamm Jena F 286

herangezogen.

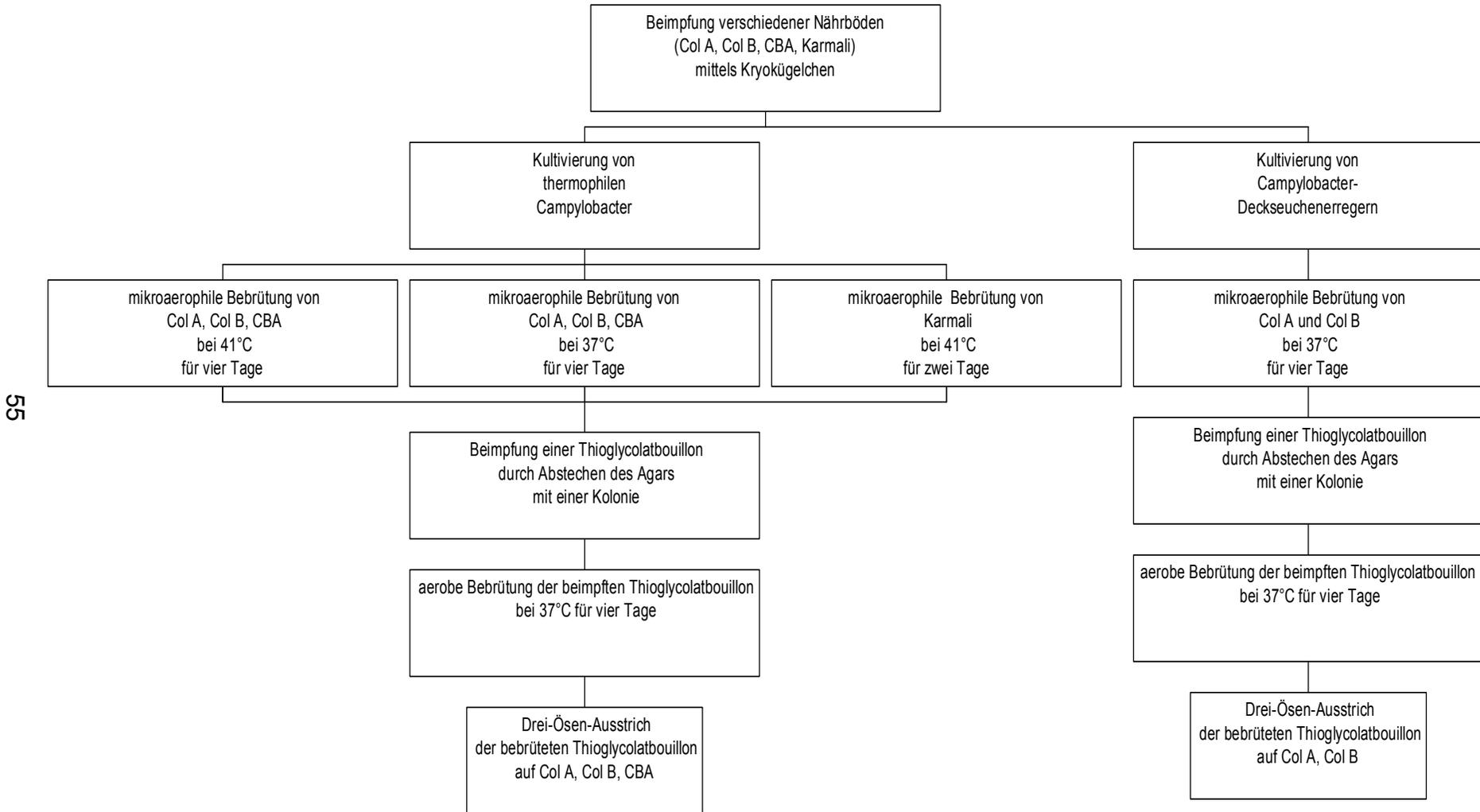
#### III.2.2.1 Mikrobankmethode

*C.*-Referenzstämme und *C.*-Feldstämme wurden mittels Mikrobankmethode bei -20°C in der Stammsammlung am STUA Aulendorf gelagert. Die Mikrobank™ ist ein steriles Kryogefäß mit je 25 porösen Keramikkügelchen in einem speziellen Kryomedium. Die Röhrchen wurden unter sterilen Bedingungen mit je einem Aliquot einer *C.*-Flüssigkultur (Thioglycolatbouillon, McFarland 3-4) beimpft, verschlossen und vorsichtig gemischt; dabei kommt es zu einer Bindung der Mikroorganismen an die Kügelchen; das Medium wurde anschließend abpipettiert, verworfen und das Kryogefäß bei -20°C gelagert. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurden unter sterilen Bedingungen zwei bis drei Kügelchen entnommen und damit das jeweilige feste Nährmedium wie unter III.2.2.2 beschrieben beimpft.

### III.2.2.2 Anzucht der Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie in **Abbildung 3** beschrieben auf Col A-, Col B-, und CBA- Nährböden. Die Nährböden wurden mit jeweils zwei bis drei Kryokügelchen beimpft und die thermophilen C.-Stämme bei 37°C und 41°C mikroaerophil vier Tage lang bebrütet. Für die thermophilen C.-Stämme fanden auch Karmali-Nährböden, mit einer um zwei Tage kürzeren mikroaerophilen Bebrütungsdauer, Verwendung. Die mikroaerophile Bebrütungsatmosphäre setzte sich bei Verwendung von Begasungsbrutschränken aus 15% Kohlendioxid, 4,5% Sauerstoff und 80,5% Stickstoff zusammen. Alternativ zu der Bebrütung in einem Begasungsbrutschrank wurden auch Anaerobiertöpfe mit Gas Generating Kits genutzt. Die beiden Deckseuchenerreger wurden auf Col A- und Col B- Nährböden angezüchtet, wobei diese nur bei 37°C vier Tage lang mikroaerophil bebrütet wurden. Für die anschließende Beimpfung einer halbfesten Thioglycolatbouillon (ohne Zusatz) mit den kultivierten Kolonien wurde jeweils mit einer kleinen Öse eine Kolonie inklusive Agar abgestochen und in eine Thioglycolatbouillon gegeben. Diese wurde bei allen Stämmen bei 37°C sieben Tage lang bebrütet und anschließend die oben beschriebenen Nährböden mit einem drei- Ösen-Ausstrich beimpft. Zur Reinheitskontrolle wurde zusätzlich jede Bouillon auf Blut- und Gassner- Nährböden ausgestrichen. Die beimpfte Thioglycolatbouillon konnte ca. eine Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt werden und bei Bedarf wurden weitere Nährböden mit dieser Bouillon beimpft.

**Abbildung 3 Schematische Darstellung der Bakterienanzucht für die Antigengewinnung**



55

### III.2.2.3 Identifizierung von thermophilen Campylobacter-Stämmen

Nach Isolierung und mikroskopischem Nachweis von *C.* wurde mit Hilfe eines API Campy der C.-Stamm näher bestimmt. API Campy ist ein Identifizierungssystem für *C.*. Das Testsystem beinhaltet für jeden Testansatz zwei Streifen mit insgesamt 20 Mikroröhrchen. In diesen Röhrchen befinden sich dehydrierte Substrate. Der erste Streifen zeigt enzymatische und konventionelle Reaktionen an. Der zweite Streifen weist Assimilations- oder Inhibitionsreaktionen nach.

#### Reaktionen des ersten Streifens

**Urease**, **Nitratreduktion**, **Esterase**, **Hippurat**. **Gamma Glutamyl Transferase (GGT)**, Reduktion von Tetrazolium (**TTC**), **Pyrrolidonyl Arylamidase**, **L-Arginin Arylamidase**, **L-Aspartat Arylamidase**, **Alkalische Phosphatase (PAL)**

#### Reaktionen des zweiten Streifens

**H<sub>2</sub>S** Produktion, **Glukose** (Assimilation), **Succinat (SUT)**, Assimilation), **Nalidixinsäure** (Empfindlichkeit), **Cefazolin (CFZ)**, Empfindlichkeit), **Acetat** (Assimilation), **Propionat** (Assimilation), **Malat (MLT)**, Assimilation), **Citrat** (Assimilation), **Erythromycin (ERO)**, Empfindlichkeit)

Die zu identifizierenden *C.*-Kolonien wurden auf Col- A, Col- B, CBA- oder Karmali-Nährböden angezüchtet und mit Hilfe einer Öse in 0,85%igem NaCl Medium (3ml), auf eine Trübung nach McFarland Nr. 6 visuell eingestellt. Mit dieser Suspension wurde der gesamte erste Streifenabschnitt sowie das erste Röhrchen des zweiten Streifens, nach Vorschrift der Arbeitsanleitung beimpft und der erste Streifen in einer vorbereiteten Inkubationswanne 24 h bei 37°C aerob bebrütet. Die restliche Bakteriensuspension wurde in eine Ampulle AUX Medium pipettiert, gemischt und damit nach Herstellerangaben die verbliebenen Röhrchen gefüllt. Der zweite Streifen wurde ebenfalls in eine mit A. dest. befeuchteten Inkubationswanne gelegt und für 24h bei 37°C in mikroaeroiphiler Atmosphäre inkubiert. Die Stoffwechselprodukte der enzymatischen und konventionellen Reaktionen (erster Streifen) führten bei aerober

Bebrütung zu einem Farbumschlag, der entweder direkt oder nach Zugabe von Reagenzien (NIT 1, NIT 2, FB, NIN, OX) visuell abzulesen war. Assimilations- oder Inhibitionsreaktionen waren die Grundlage des zweiten Streifens und bei Verwertung des Substrates durch die Bakterien bzw. einer Resistenz gegen das jeweilige Antibiotikum, war ein Wachstum der Bakterien und somit eine Trübung des Röhrchens zu erkennen. Die Katalase-Reaktion wurde zusätzlich geprüft und mit den visuell abgelesenen Ergebnissen auf die im Testsystem enthaltenen Ergebnisblätter eingetragen. Anhand dieses Ergebnisblattes wurden die Reaktionen in ein numerisches Profil umgewandelt, welches mit einer Liste in der Arbeitsanleitung verglichen wurde oder mit einer Identifizierungssoftware durch Eingabe des 7-stelligen Profils zur Identifizierung des Erregers führte.

### **III.2.3 Antigenherstellung**

#### **III.2.3.1 Gewinnung der Kolonien**

Gewonnen wurden die Kolonien zum einen durch Abschwemmen von den Festnährböden mit PBS bzw. A. dest. und zum anderen durch Abnahme der Kolonien mit Hilfe einer Öse. Abgeschwemmt wurden die Kolonien indem 5 ml A. dest. bzw. PBS auf eine dicht bewachsene Agarplatte pipettiert und die Kolonien mit einem Spatel abgelöst wurden. Die somit auf der Agarplatte entstandene Suspension wurde in 50 ml PP-Röhrchen pipettiert. Bei der Abnahme mit Hilfe einer Öse wurden in ein 50 ml PP-Röhrchen etwa 5 ml A. dest. bzw. PBS vorgelegt und die mit der Öse abgenommenen Kolonien darin suspendiert.

Die Suspension wurde anschließend für 20 min bei 20°C und 1 700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment erneut je nach Versuchsansatz in A. dest. bzw. PBS resuspendiert. Die Zentrifugation und Resuspension des Sedimentes kann als Waschvorgang bezeichnet werden. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Suspension mit A. dest. bzw. PBS auf eine Trübung nach McFarland Nr. 6 eingestellt. Vergleichend hierzu wurde dieselbe Suspension ungewaschen eingesetzt.

### **III.2.3.2 Antigen-Fragmentierung**

Von der je nach Versuchsansatz mit A. dest. bzw. PBS auf eine Trübung nach McFarland Nr. 6 eingestellten Bakteriensuspension wurden jeweils 5 ml in Handhomogenisatoren pipettiert. In diesen wurde die Suspension im Eiswasserbad mittels Ultraschall so lange beschallt, bis mikroskopisch ca. 90% der Bakterien als Bruchstücke zu erkennen waren. Überprüft wurde der Beschallungserfolg und die Sterilität des Antigens durch die Beimpfung und Kultivierung von Blutplatten, Col A-, Col B-, und CBA- Agarplatten.

Um den Unterschied zwischen beschalltem und nicht beschalltem Antigen festzustellen, wurde ein Teil der Suspension ohne Beschallung für den ELISA verwendet.

### **III.2.3.3 Präparation von Campylobacter-Flagellin**

Eine weitere Möglichkeit der Antigenfragmentierung stellte die von LOGAN und TRUST (1983) beschriebene Isolierung von Flagellinproteinen durch Zentrifugation bei 10000 x g dar. Die Kolonien wurden mit einer Öse von den Nährböden abgenommen, homogenisiert, nicht gewaschen und auf eine Trübung nach McFarland Nr. 6 eingestellt. Mit dieser Suspension wurden Reaktionsgefäße zu je einem ml gefüllt und für 1 h bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Proteingehalt des Überstandes und des resuspendierten Pellets photometrisch bestimmt. Für die Beschichtung wurden vergleichend der Überstand und das resuspendierte Pellet verwendet.

### **III.2.4 Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Antigen suspension boten sich mehrere Möglichkeiten. Nachfolgend die drei eingesetzten Verfahren, um den Proteingehalt des Antigens bestimmen zu können:

#### **III.2.4.1 Proteinbestimmung nach LOWRY**

Die Proteinkonzentration der Antigen suspensionen wurde nach der von LOWRY et al. (1951) beschriebenen Methode bestimmt. Diese stellt eine Abwandlung der Biuret-

Reaktion dar. Drei Reagenzien, bestehend aus Reagenz A, B und C bildeten die Grundlage der Reaktion. Reagenz A bestand aus 100g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst in 1l 0,5 N NaOH. Für Reagenz B wurden 1g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml A. dest. gelöst. 2g Kaliumtartrat wurden für Reagenz C in 100 ml A. dest. in Lösung gebracht. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde eine 0,03 %ige Rinderserumalbumin-Lösung in 10 numerierte Reagenzglasröhrchen nach folgendem Schema pipettiert: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 ml. Jedes dieser Röhrchen wurde mit A. dest. auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Auch die zu bestimmenden Proben wurden in Reagenzgläser pipettiert und die Proteinkonzentration wie folgt bestimmt: 15 ml Reagenz A, 0,75 ml Reagenz B und 0,75 ml Reagenz C wurden gemischt und jeweils 1 ml den einzelnen Röhrchen zugegeben. Diese inkubierten für 15 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von je 3,0 ml einer Folin-Phenol-Lösung (5,0 ml Folin-Phenol-Reagenz in 50 ml A. dest.) musste die Lösung sofort gemischt werden und anschließend für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Absorptionen der Standardverdünnungen wurden bei 540 nm gemessen und in einer Eichkurve graphisch dargestellt. Die Proteinkonzentrationen der zu bestimmenden Proben wurden nach Messung der Absorptionen bei 540 nm anhand der Eichgeraden abgelesen.

### III.2.4.2 Proteinbestimmung mit Merckotest® (Biuret)

Merckotest® beinhaltet einen vollständigen Reagenziensatz für photometrische Bestimmungen der Eiweiß-Konzentration in Serum, Plasma und Liquor. Grundlage dieser Bestimmung ist die Biuret-Methode. Zur Bestimmung der Proteinmenge der Antigensuspension wurde die beschriebene Eiweiß-Bestimmung in Liquor verwendet. Im Reagenziensatz enthalten waren Biuret-Reagenz (Konzentrat), Vergleichsreagenz (Konzentrat), sowie eine Standardlösung (6g/100 ml). Zwei ml der zu bestimmenden Proteinsuspension wurden mit 0,2 ml Biuret-Reagenz- Konzentrat vermischt und inkubierten 30 min bei Raumtemperatur. Die Extinktion dieses Ansatzes wurde gegen eine Blindprobe aus 2ml Wasser und 0,2 ml Biuret-Reagenz-Konzentrat bei 546 nm gemessen. Als Kontrolle wurde stets eine Standardlösung (60mg/ml) mitbestimmt. Die Berechnung der Eiweiß-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Eiweiß-Konzentration (mg/100ml)} = \text{Extinktion der Analyse} \cdot 400$$

### III.2.4.3 Photometrische Proteinbestimmung (ohne Farbreaktion)

Der Proteingehalt des durch Beschallung bzw. Zentrifugation hergestellten Antigens wurde auch ohne Reagenzien spektralphotometrisch bestimmt. Die Suspension wurde auf eine Trübung nach McFarland Nr. 3 eingestellt und bei 260nm, 280nm und 320nm gemessen. (260nm = Nukleinsäuren, 280nm = Protein, 320nm = Verunreinigungen). Die somit ermittelten Werte führten dann rechnerisch nach folgender Rechnung (PHARMACIA BIOTECH, 1993) zu dem Proteingehalt pro ml Lösung:

$$\text{Protein (mg/ml)} = 1,55 \times (A_{280} - A_{320}) - 0,76 \times (A_{260} - A_{320})$$

Die Antigensuspension wurde nach erfolgter Proteinbestimmung in 2ml Reaktionsgefäße aliquotiert, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Neben der Proteinbestimmung der Antigensuspensionen wurde auch die Proteinmenge einer Lösung bestimmt, welche durch das Abschwemmen nicht beimpfter Col A- und Col B- Agarplatten mit jeweils 5 ml A. dest. gewonnen wurde. Das A. dest. wurde hierzu mit einem Spatel auf den Agarplatten verteilt, die Lösung in ein 50 ml PP-Röhrchen abgekippt und photometrisch die Proteinmenge bestimmt.

### III.2.5 Antigenbeschichtung

#### III.2.5.1 Auswahl der Mikrotiterplatten

Als Festphase wurden Nunc MaxiSorp<sup>TM</sup>- und Nunc Polysorp<sup>TM</sup>- Platten, jeweils 96-Lochplatten, vergleichend eingesetzt. MaxiSorp<sup>TM</sup>- wie Polysorp<sup>TM</sup>- Platten bestehen beide aus einer Polystyroloberfläche mit unterschiedlichen Bindungskapazitäten für Proteine oder Antikörper. MaxiSorp<sup>TM</sup>- Platten haben eine hohe Affinität zu Proteinen und Molekülen mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen, wie sie z. B. bei Antikörpern vorkommen. Für Nicht- Antikörper-Beschichtungen und Beschichtungen mit hydrophoben Molekülen eignen sich laut NUNC<sup>TM</sup> (2001) vor allem Polysorp<sup>TM</sup>- Platten. Um die geeignete Festphase für die Beschichtung zu ermitteln, wurden sowohl MaxiSorp<sup>TM</sup>- als auch Polysorp<sup>TM</sup>- Platten mit unterschiedlichen

Antigenkonzentrationen beschichtet und die verwendeten Feldseren sowie die Seren der immunisierten Schweine in unterschiedlichen Verdünnungen, aufgetragen. Als Kontrolle wurde in einige Vertiefungen nur Magermilchpuffer (MMP) anstelle der Seren pipettiert.

### III.2.5.2 Auswahl des Beschichtungspuffers

Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde das Antigen in Carbonatpuffer, PBS oder A. dest. an die Mikrotiterplatte gebunden. Zur Kontrolle wurde jeweils die entsprechende Lösung ohne Antigen pipettiert, bzw. die Vertiefung leer gelassen; d.h. weder mit Antigen beschichtet, noch mit reinem Beschichtungspuffer pipettiert. Die so vorbereiteten Vertiefungen wurden mit verschiedenen Verdünnungen der Hyperimmunseren vergleichend inkubiert.

### III.2.5.3 Antigenkonzentration für die Beschichtung

Die Antigenkonzentration für die Beschichtung (100µl/well) der Mikrotiterplatten wurde festgelegt, indem unterschiedliche Konzentrationen vergleichend eingesetzt wurden. Die Antigenkonzentrationen bei Einzelantigenen von C.c. oder C.jej. lagen bei 5 µg bis 50 µg Antigen-Protein pro ml Suspension. Eine Kombination von C.c. und C.jej. wurde mit je 5 und je 10 µg pro ml getestet.

**Abbildung 4** zeigt ein typisches Entwicklungs-Pipettierschema mit unterschiedlichen Antigen- und Antikörpermengen, das zudem den Vergleich unterschiedlicher Puffer oder Seren oder Konjugatkonzentrationen ermöglicht, da die obere und untere Plattenhälfte identisch sind. Seren in verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:100 und 1:400) wurden vergleichend auf den einzelnen Beschichtungsantigenkonzentrationen der oberen und unteren Hälfte der Mikrotiterplatte getestet.

**Abbildung 4** Entwicklungs-Pipettierschema zur Bestimmung der Beschichtungs-Antigenkonzentration und der Konjugatverdünnung

Serumver- dünnung	Ag-Konzentration: 5µg/ml,			Ag-Konzentration: 10µg/ml,			Ag-Konzentration: 20µg/ml,			Ag-Konzentration: 40µg/ml,			
	Beschichtung mit:			Beschichtung mit:			Beschichtung mit:			Beschichtung mit:			
	Ag/Puffer	nur Puffer	leer	Ag/Puffer	nur Puffer	leer	Ag/Puffer	nur Puffer	leer	Ag/Puffer	nur Puffer	leer	
1:50													
1:100				<b>Konjugat 1:2500</b>									
1:400													
MMP													
1:50													
1:100				<b>Konjugat 1:5000</b>									
1:400													
MMP													

### **III.2.5.4 Unterschiedliche Beschichtungsbedingungen**

Es wurden verschiedene Methoden der Beschichtung getestet, z.B. die beschichteten Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur etwa 16 Stunden inkubieren zu lassen und anschließend direkt zu verwenden. Eine Abwandlung der Beschichtung stellte das Eintrocknen lassen des Antigens im Brutschrank dar. Hierfür wurde die Mikrotiterplatten in zwei Hälften geteilt, beide Seiten identisch beschichtet, je eine Hälfte mit einer selbstklebenden Abdeckfolie verschlossen und die andere Hälfte mit einem sauberen Baumwolltuch abgedeckt. Diese Platten wurden in einen 37°C beheizten Brutschrank gestellt und dort solange belassen, bis das Antigen auf der nicht abgeklebten Seite vollständig eingetrocknet war. Auf diese Platten wurden vergleichend auf beide Hälften mehrere Seren pipettiert. Des Weiteren wurden beschichtete Platten, die bereits 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert hatten, bei -20°C eingefroren. Zwei Vorgehensweisen kamen hierbei zum Einsatz: die erste bestand darin, die Mikrotiterplatten mit dem bereits inkubierten Antigen einzufrieren und die zweite, das Antigen nach Inkubation durch 200µl Blockpuffer (MMP) pro Vertiefung zu ersetzen und dann einzufrieren.

### **III.2.6 Durchführung des ELISA**

#### **III.2.6.1 Auswahl der Waschlösung und des Blockpuffers**

Als Waschlösung wurde eine 0,05 % Tween enthaltende PBS-Lösung verwendet. Alle eingesetzten Lösungen wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Durch Zugabe von 5 % Magermilchpulver zu der Waschlösung entstand ein Blockpuffer (MMP) sowie ein Verdünnungspuffer für die Schweineseren, Fleischsaftproben und das Konjugat. Durch die Verwendung von PBS ohne Tween mit 5% Magermilchpulver stand auch ein Blockpuffer ohne Detergenzien zur Verfügung. Vergleichend wurde auch eine Waschlösung und ein Blockpuffer aus PBS mit 3 % Bovinem Serumalbumin verwendet.

### III.2.6.2 Waschvorgang der Mikrotiterplatten

Das Waschen der Mikrotiterplatten nach den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit Hilfe eines 12-Kanal-Waschkammes durchgeführt. Die Kavitäten wurden mit 300µl Waschlösung befüllt und anschließend durch Auskippen der Platten wieder geleert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Platten auf Zellstoff ausgeklopft. Der erste Waschvorgang fand nach dem Blocken mit MMP statt; um dessen Notwendigkeit beurteilen zu können, wurden zwei beschichtete Mikrotiterplatten mit denselben Proben pipettiert. Eine der beiden wurde nach dem Abkippen des MMP dreimal gewaschen, auf die andere Platte wurden nach dem Abkippen die Proben pipettiert. Dreimaliges Waschen folgte auf die Inkubation der Seren- bzw. Fleischsaftproben. Nicht gebundenes Konjugat wurde durch fünf Waschschriffe vor der Substratzugabe entfernt.

### III.2.6.3 Verdünnung der Proben

Geeignete Verdünnungen der Seren und des Fleischsaftes mussten für jeden Versuchsansatz festgelegt werden. Die Feldseren wurden in den Vorversuchen 1:50 bis 1:400 verdünnt. Die Verdünnung des Fleischsaftes lag bei 1:4 bis 1:100. Die Seren- und Fleischsaftproben der Versuchsschweine wurden von 1:50 bis 1:102 400 (d.h.  $\log_{10}$  1,7 bis 5,0) titriert. Serum- und Fleischsaftproben wurden mit MMP entweder auf PP-Verdünnungsplatten oder auf PolySorp<sup>TM</sup>-Platten vortitriert und dann auf die ELISA-Platten überpipettiert. Auch bei Verwendung des Pipettierautomaten wurden die Verdünnungsplatten genutzt.

## Verdünnungsschema für Serum- und Fleischsaftproben

### Serum- und Fleischsaftverdünnung

Verdünnungsplatte	180 µl MMP	
	20 µl Serumprobe	Verhältnis 1 : 10

## Methode

---

Verdünnungs- oder	180 µl	MMP	
Testplatte	20µl	vorverdünnte Probe aus Verdünnungsplatte	
			<b>Verhältnis 1 : 100</b>

Testplatte	75 µl	MMP	
	25 µl	vorverdünnte Probe aus Verdünnungsplatte	
			<b>Verhältnis 1 : 400</b>

### Fleischsaftverdünnung

Verdünnungsplatte	130 µl	MMP	
	20 µl	Fleischsaftprobe	Verhältnis 1 : 7,5

Testplatte	75 µl	MMP	
	25 µl	vorverdünnte Probe aus Verdünnungsplatte	
			<b>Verhältnis 1 : 30</b>

### **III.2.6.4 Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Schwein Konjugates**

Es wurde ein Ziege-anti-Schwein IgG(H+L) x PO markiertes Konjugat zum Nachweis der gebundenen Antikörper verwendet. In Anlehnung an die Herstellerangaben wurden Konjugatverdünnungen von 1: 2500 bis 1: 25000 (je 100µl/well) vergleichend eingesetzt. Zu jedem verwendeten Beschichtungspuffer wurden bei den einzelnen Tests immer einige beschichtete Vertiefungen ohne Serum, d.h. nur mit MMP pipettiert, um unspezifische Reaktionen des Konjugates abzuklären.

Siehe hierzu auch das Entwicklungs-Pipettierschema zur Bestimmung der Beschichtungs-Antigenkonzentration und der Konjugatverdünnung in **Abbildung 4**.

### III.2.7 Produktion von porcinen Antikörpern (als positive Kontrolle)

#### III.2.7.1 Impfschweine

Von den 6 Impfschweinen wurden 3 Schweine mit C.c. und drei weitere Schweine mit C. jej. immunisiert. In **Tabelle 6** sind die sechs eingesetzten Schweine mit den genauen Kennzeichnungen, dem Gewicht vor der ersten Immunisierung und dem jeweils verwendeten Antigen dargestellt.

**Tabelle 6** Daten der eingesetzten Versuchsschweine vor der ersten Immunisierung (Tag 0) sowie Zuordnung der verwendeten Antigene

	Kennzeichnung durch Ohrenmarken		Gewicht an Tag 0	Antigen für Immunisierung
Schwein 1	931	N 441/4	31 kg	C.c.
Schwein 2	916	H 435/1	28 kg	C.c.
Schwein 3	1000	H 435/4	24 kg	C.c.
Schwein 4	921	N 435/1	28 kg	C.jej.
Schwein 5	981	N 441/3	28 kg	C.jej.
Schwein 6	955	H 435/3	26 kg	C.jej.

#### III.2.7.2 Mikrobiologische Untersuchung von Sammelkotproben und Seren der Versuchsschweine

Je eine zu Beginn der Immunisierung und eine bei der Schlachtung gewonnene Sammelkotprobe wurden kulturell auf thermophile C. untersucht. Die Proben wurden auf Col A-, Col B- und Karmali- Nährböden direkt mit einem 3-Ösen-Ausstrich angelegt und zwei bzw. vier Tage bei 41°C mikroaerophil bebrütet.

Die Identifizierung der gewachsenen Kolonien erfolgte zunächst morphologisch, indem mit einer Öse ein Teil einer Kolonie mit physiologischer NaCl-Lösung verrieben und mit einem Deckglas abgedeckt wurde. Im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung erschienen die Keime als bewegliche, geschraubt aussehende Stäbchen. Anschließend wurde durch einen Campy API der Stamm differenziert.

Die Schlachtseren der Versuchstiere wurden außerdem auch auf Antikörper gegen Europäische Schweinepest, Morbus Aujeszky, Porcine Parvovirose, PRSS (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome) und Salmonellose untersucht.

### III.2.7.3 Herstellung der Vakzine

Die Herstellung der C.-Vakzine wurde in Anlehnung an SEMMLER (1999) durchgeführt. Zur Kultivierung der Bakterien dienten Col A-, Col B- und CBA-Agarplatten. 0,1 ml einer C.c.- sowie C.jej.-haltigen Thioglycolatbouillon wurden auf die Nährböden pipettiert und ausgespatelt. Die jeweilige Bouillon war zuvor durch Ausstreichen auf Blut- und Gassner-Agar und anschließender zweitägiger aerober Bebrütung bei 37°C auf ihre Reinheit überprüft worden. Die mit Thioglycolatbouillon beimpften Agarplatten wurden bei 41°C unter mikroaerophilen Bedingungen für vier Tage bebrütet.

Nach vier Tagen wurden die Bakterienkolonien je einer Agarplatte mit 5 ml einer sterilen PBS-Lösung in Zentrifugengläser abgeschwemmt. Die Suspensionen wurden bei 1 700 x g 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgekippt, das Sediment mit steriler PBS-Lösung resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Das nach dreimaligem Waschen gewonnene Sediment wurde mit 10 ml steriler PBS-Lösung resuspendiert und in ein steriles Homogenisatorenglas pipettiert. Die Bakterien-suspension wurde mit einem Ultraschallstab im Eiswasserbad 15 Minuten bei Stufe 6, die etwa 70 Watt entspricht, beschallt, anschließend auf eine Trübung größer McFarland Nr. 6 eingestellt und mit einer Formaldehydlösung in einer Endkonzentration von 1% inaktiviert. Dazu wurde zunächst für 18 Stunden bei 37°C und anschließend für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubation wurde wieder bei 1 700 x g 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Sediment wurde dann mit 0,85%iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die gewaschene Suspension wurde auf größer McFarland Nr. 6 eingestellt und folgenden Sterilitätskontrollen unterzogen: 0,1 ml aus jeder hergestellten Suspension wurden in eine Leber-Leber-Bouillon pipettiert und mit heißem Paraffinöl überschichtet. Diese Bouillon wurde 6 Tage bei 37°C bebrütet. Des Weiteren wurden je ein Blut- und ein Gassner-Agar mit

der Suspension beimpft und bei 37°C für 48 h aerob bebrütet. Um sicherzustellen, dass der Impfstoff vollständig inaktiviert war, wurden zusätzlich noch Col A-, Col B- und CBA- Platten beimpft und vier Tage bei 41°C unter mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Nach Feststellung der Sterilität und der vollständigen Inaktivierung von C. in den einzelnen Suspensionen wurden diese 1:2 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans versetzt und in sterilen Glashomogenisatoren emulgiert. Der Impfstoff wurde in 9 ml Vacuetten® pipettiert und bis zur Immunisierung bei 6°C gelagert.

#### III.2.7.4 Durchführung der Immunisierung und Blutprobenentnahme mit Serumgewinnung

Zur Immunisierung und Blutprobenentnahme wurden die Schweine mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Insgesamt wurden die Tiere dreimal mit je  $> 2,5 \times 10^9$  Bakterien immunisiert. Dabei wurden 8 ml Vakzine intramuskulär am Ohrgrund, auf beide Seiten verteilt (je 4 ml), injiziert. Drei Tieren wurde eine C.c.-Vakzine und den anderen 3 Tieren eine C.jej.-Vakzine verabreicht. Dies geschah an Tag 0, Tag 29 und an Tag 98. An Tag 0 wurde den Tieren vor der ersten Immunisierung zum ersten Mal Blut aus der V. jugularis entnommen, um den Ausgangsstatus der einzelnen Tiere bestimmen zu können. Weitere Blutentnahmen folgten an Tag 29, Tag 63, und Tag 98. Der Zeitplan des Versuchsablaufes ist in **Tabelle 7** dargestellt. Die Blutproben wurden in 10 ml Blutröhrchen gewonnen. Diese wurden 24 h bei 6°C gelagert und anschließend bei 1700 x g zentrifugiert. Das somit gewonnene Serum wurde in 2,0 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 7 Zeitplan der Vakzinierung zur Antikörpergewinnung**

Zeitpunkt	Blutentnahme	Immunisierung	Fleischsaftgewinnung
Tag 0	x	x	
Tag 29	x	x	
Tag 63	x		
Tag 98	x	x	
Tag 112	x		x

### **III.2.7.5 Gewinnung von Serum und Fleischsaft bei der Schlachtung**

Die Schlachtung der Schweine erfolgte 112 Tage nach der ersten Immunisierung auf der Versuchsstation in Eningen. Am Abend zuvor wurden sie in ein spezielles Warteabteil im Schlachtgebäude gebracht. Nach der elektrischen Betäubung mit Handzangen wurden die Schweine hängend entblutet. Das Blut jedes Tieres wurde jeweils in einem, mit der entsprechenden Ohrmarkennummer gekennzeichneten Weithalsfass aufgefangen. Nach dem Spalten der Tierkörper wurden von jedem der sechs Schweine Muskelproben aus dem Zwerchfellpfeiler und der Halsmuskulatur entnommen. Die Muskelproben wurden unmittelbar nach der Entnahme zerkleinert und in zuvor entsprechend gekennzeichnete Fleischsafttrichter gefüllt. Diese wurden etwa drei Stunden später bei -20°C eingefroren. Das gewonnene Blut wurde für 16 h bei 6°C gelagert und anschließend das sich gebildete Serum in 200 ml Zentrifugengläser abpipettiert. Die Seren wurden bei 1 700 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand in 50 ml PP-Röhrchen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

### **III.2.8 Bestimmung der Campylobacter-Antikörper in den Hyperimmunseren und in den Fleischsaftproben der Impfschweine**

Die Fleischsafttrichter mit integriertem Auffang-Röhrchen wurden, nachdem sie für zwei Wochen eingefroren waren, bei Raumtemperatur über Nacht aufgetaut. Da von jedem Schwein mehrere Fleischsaftbehälter gefüllt worden waren, wurde der gewonnene Fleischsaft jedes Schweines in 50 ml PP-Röhrchen gepoolt und in einige 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Die nicht unmittelbar zur Untersuchung benötigten Proben wurden bei -20°C gelagert.

Getestet wurden die einzelnen Seren und Fleischsaftproben der vakzinierten Schweine vergleichend auf Beschichtungen mit C.c. und C.jej. sowie auf einer Mix-Beschichtung aus den beiden C.-Stämmen. Wie der nachstehenden Aufzählung zu entnehmen ist, standen fünf Seren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Immunisierung gewonnen worden waren (**Tabelle 7**), zur Verfügung:

- 0 Probe vor der ersten Immunisierung, Tag 0
- 1 Probe, ca. einen Monat nach der ersten Immunisierung, Tag 29
- 2 Probe, ca. einen Monat nach der zweiten Immunisierung, Tag 63
- 3 Probe, ca. zwei Monate nach der zweiten Immunisierung, Tag 98
- 4 Schlachtseren, zwei Wochen nach der dritten Immunisierung, Tag 112

Diese fünf Seren und die Fleischsaftprobe wurden für jedes Schwein separat auf den oben beschriebenen Mikrotiterplatten getestet. Dazu wurden die Platten mit Antigen in einer Konzentration von 10µg/ml (100µl/well) über Nacht bei Raumtemperatur (RT) beschichtet und anschließend 1 Stunde bei RT mit MMP (200µl/well) geblockt. Die in MMP vortitrierten Proben wurden in die Testplatten überpipettiert (100µl/well) und 1 Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten erfolgte für 1 Stunde bei RT die Inkubation mit dem Konjugat: Ziege-anti-Schwein IgG(H+L) x PO, 1:5000 in MMP (100µl/well). Nach fünfmaligem Waschen wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl/well TMB-Substrat sichtbar gemacht und nach 15 Minuten mit je 100µl 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Das Ergebnis der Serumtitration in Verdünnungen von log<sub>10</sub> 1,7 bis 5,0 verdeutlicht den Verlauf der Immunisierung und die Entwicklung der Antikörperbildung.

### III.2.9 Homogenität der beschichteten Mikrotiterplatten

Die Homogenität der Plattenbeschichtung wurde nach der Nunc<sup>TM</sup> Zertifikation von MaxiSorp<sup>TM</sup> Mikrotiterplatten durchgeführt (ESSER, Nunc<sup>TM</sup>, 1997). Mit C.c., C. jej. und mit einem Mix (C.c. und C. jej.) beschichtete Nunc PolySorp<sup>TM</sup> Mikrotiterplatten wurden mit Serumverdünnungen inkubiert. Dabei wurde in alle Vertiefungen einer beschichteten Platte dieselbe Serumverdünnung aufgetragen und der ELISA wie oben beschrieben durchgeführt. Der Variationskoeffizient der gemessenen OD-Werte wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Variationskoeffizient} = S \times \frac{100\%}{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}} \times \frac{100\%}{\bar{X}}$$

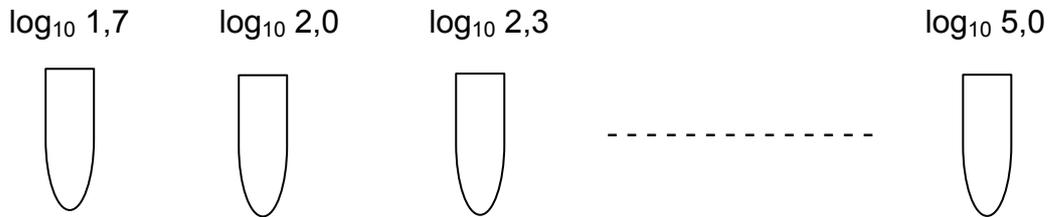
### III.2.10 Präadsorption der Versuchsschweine-Schlachtseren mit homologem Antigen bzw. mit E. coli

Zur Beurteilung der C.-Spezifität der Hyperimmunseren wurden diese, wie in **Abbildung 5** schematisch dargestellt, mit homologem Antigen (C.c. und C.jej.) präadsorbiert. Dazu wurde von zwei Seren, einem C.jej.-, sowie einem C.c.- Serum, jeweils eine Verdünnungsreihe von  $\log_{10} 1,7$  bis  $\log_{10} 5$  angelegt. Als Antigensuspension wurde Beschichtungsantigen in konstanter Konzentration (Dichte: McFarland Nr. 6) verwendet. Von jeder Serumverdünnungsstufe wurden 300 $\mu$ l mit 300 $\mu$ l homologer Antigensuspension in 2ml Reaktionsgefäßen gemischt. Als Vergleich wurde jede Serum-Verdünnungsstufe der beiden Seren mit der gleichen Menge an A. dest. gemischt. Die Serum- Antigensuspensionen, sowie die Vergleichskontrollen inkubierten 2h bei 37°C auf einem Kreisschüttler und wurden anschließend zur Entfernung des Antigens bei 10000 x g 20 min zentrifugiert. Der jeweilige Überstand wurde auf C.c., C.jej. und Mix (C.c. und C.jej.) beschichtete Platten pipettiert und der ELISA wurde wie bereits beschrieben weitergeführt.

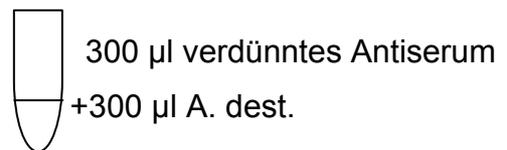
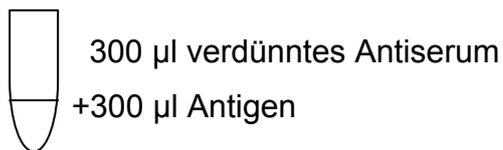
Um die Kreuzreaktivität der Seren mit anderen Enterobacteriaceae beurteilen zu können, wurde eine E.coli Antigensuspension analog der Herstellung der C.-Antigensuspension angefertigt. Die Präadsorption der Seren mit E.coli Antigen wurde vergleichend wie die oben beschriebene Präadsorption mit C. Antigen durchgeführt.

**Abbildung 5 Schematische Darstellung der Durchführung einer Präadsorption der Hyperimmunsereen mit Antigen**

**1. Verdünnung der Antiseren von  $\log_{10}$  1,7 bis  $\log_{10}$  5,0**



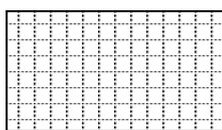
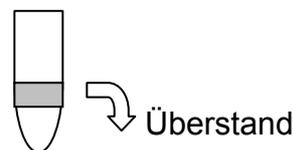
**2. Mischung der jeweiligen Antiserum-Verdünnung mit Antigen bzw A. dest.**



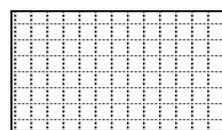
Inkubation dieser Mischungen für 2 Stunden bei 37°C

**3. Zentrifugation der inkubierten Mischungen 10 000 x g für 20 min**

**4. Verwendung des Überstandes zur Antikörperbestimmung im Elisa**



Mikrotiterplatte



Mikrotiterplatte

### **III.2.11 Überprüfung von Kreuzreaktivitäten mit anderen Campylobacter-Stämmen**

Durch den Einsatz von *C. lari* DSM 11375 als Beschichtungs-Antigen wurde eine mögliche Kreuzreaktion der Feld- und Hyperimmunseren mit anderen thermophilen Campylobacter-Stämmen im ELISA untersucht.

Die beiden Deckseuchenerreger *C. fetus* ssp. *venerealis* Referenzstamm TiH Hannover PB 242/01 (92) und *C. fetus* ssp. *fetus* Feldstamm Jena F 286 wurden gleichermaßen eingesetzt, um ebenfalls Aussagen über die Kreuzreaktivität der Hyperimmun- und Feldseren machen zu können. Die Antigenpräparation bestand auch hier darin, die jeweiligen Kolonien von der Platte zu nehmen, zu beschallen und den Proteingehalt photometrisch zu bestimmen, um die Mikrotiterplatten mit vergleichbaren Antigenmengen zu beschichten. Insgesamt wurden zur Überprüfung der Kreuzreaktivität 6 Hyperimmunseren (Schlachtseren), 6 Seren der Impfschweine vor der ersten Immunisierung, 6 Ferkelseren, sowie 20 Feldseren aus zwei Einsendungen auf mit *C.c.*, *C.jej.*, Mix (*C.c./C.jej.*), *C. fetus* ssp. *venerealis*, *C. fetus* ssp. *fetus* und mit *C. lari* beschichteten Platten eingesetzt.

### **III.2.12 Exemplarische Anwendung des ELISA**

#### **III.2.12.1 Bestimmung von Campylobacter-Antikörpern in Feldserumproben**

Insgesamt wurden 408 Schweineserumproben willkürlich aus Feldmaterial ausgewählt, die zur serologischen Untersuchungen auf verschiedene Schweinekrankheiten (Aujeszky, PRRS, Salmonellose) an das STUA Aulendorf eingesandt worden waren. Im Anschluss an die jeweiligen Routineuntersuchungen wurden diese auf *C.*-Antikörper untersucht. Dabei wurden vor allem Proben verwendet, die im Auftrag des Landeskontrollverbandes (LKV) auf Salmonellen-Antikörper untersucht worden waren. Die Numerierung der Einsendungen erfolgte ohne besonderes System, die Probenanzahl jeder Einsendung variierte. Die Proben-Einsendungen wurden in verschiedenen Verdünnungen mit unterschiedlichen Antigen-Beschichtungen untersucht. Es wurden 7 Einsendungen von 1:100 und 1:400 verdünnten Schweineserumproben (n=133) vergleichend auf mit *C.c.*, *C.jej.* und einer



Jahr verteilt eingesandt worden waren, untersucht. Die Proben waren in Deep-well Platten umpipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. Für die C.-Antikörper Bestimmung wurden die einzelnen Einsendungen aufgetaut und die 1:100 verdünnten Proben bestandsweise auf mit C.c./C.jej. (Mix) beschichteten Platten untersucht.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **IV.1 Entwicklung des ELISA**

#### **IV.1.1 Verwendung unterschiedlicher Campylobacter-Stämme als Antigen**

##### **IV.1.1.1 Thermophile Campylobacter-Stämme für die Antigenbeschichtung**

Alle eingesetzten C.c.- und C.jej.- Stämme konnten prinzipiell als geeignet für die Antigenherstellung angesehen werden. Der C.c. Feldstamm B 243 zeigte bei den reaktiven Seren höhere OD-Werte als der C.c. Referenzstamm. Kolonien des C.jej. DSM-Stammes waren im Vergleich zum C.jej. CCUG-Stamm sehr schlecht von dem Nährboden abzunehmen und die daraus hergestellte Suspension schäumte während der Beschallung sehr stark. Daher wurden die Antikörperuntersuchungen im wesentlichen mit dem Feldstamm C.c. B 243 und C.jej. CCUG-Stamm als Beschichtungsantigen durchgeführt.

##### **IV.1.1.2 Identifizierung der Campylobacter-Stämme**

Wie **Tabelle 8** zeigt, wurden folgende Referenz- bzw. Feldstämme mit dem Api Campy (BIO MERIEUX) identifiziert:

- Campylobacter coli DSM 4689 → mit 97,6% als Taxon der ersten Wahl
- Campylobacter jejuni CCUG 10935 → mit 81,5% als Taxon der ersten Wahl
- Campylobacter lari DSM 11375 → mit 96,9% als Taxon der ersten Wahl
- Campylobacter coli Feldstamm B 243 → mit 99,9% als Taxon der ersten Wahl
- Campylobacter coli Stamm aus Kotprobe der Versuchsschweine → mit 99,8 % Taxon der ersten Wahl

**Tabelle 8 Darstellung der Identifizierungsergebnisse von Campylobacter Referenz- und Feldstämmen mittels Api Campy (BIO MERIEUX)**

Reaktionen	C.c. DSM	C. jej. CCUG	C. lari DSM	C.c.- Feldstamm	C.c.- Stamm d. Impfschw.
URE	-	-	-	-	-
NIT	+	+	-	+	+
EST	+	+	-	+	-
HIP	-	-	-	-	-
GGT	-	-	-/+	-	-
TTC	+	+	-/+	-	+
PyrA	-	-	-	-	-
ArgA	+	-	-	+	+
AspA	-	-	-	-	-
PAL	-	+	-	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
GLUa	-	-	-	-	-
SUT	+	+	-	+	+
NAL	-	-	-	-	-
CFZ	-	+	-	-	+
ACE	-/+	-	-	+	-
PROP	+	-	-	+	+
MLTa	-	+	-	-	-
CITa	-	-	-	-	-
ERO	-	-	-	+	+

## IV.1.2 Antigengewinnung

### IV.1.2.1 Anzucht der Bakterien

Die thermophilen C.-Stämme zeigten auf Col A- und Col B- Platten das zuverlässigste Wachstum. C.c.-Stämme ließen sich auf CBA-Platten nur sehr schlecht kultivieren. Als geeignete Bebrütungstemperatur der thermophilen C.-Stämme erwiesen sich 37°C. Auch bei 41°C ließen sich alle thermophilen Stämme anzüchten, wobei die Kolonien dabei ein schleimiges Wachstum zeigten. Ein zuverlässiges, aber ebenfalls schleimiges Wachstum zeigten die thermophilen C. auf den Karmali-Nährböden. Für die Gewinnung von Antigenen waren diese Platten ungeeignet, da C.jej.-Kolonien sich nur schlecht vom Nährboden abheben ließen und Bestandteile des schwarzen Nährbodens bei der späteren Proteinbestimmung Schwierigkeiten bereitete. C. fetus ssp. fetus und C. fetus ssp. venerealis zeigten bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C auf Col A- und Col B- Platten optimales Wachstum.

#### IV.1.2.2 Gewinnung der Kolonien

Die Gewinnung der Kolonien mittels Abschwemmen führte zu einer rötlichen Färbung und starken Trübung der Suspension. Bei der vergleichenden Abnahme einer entsprechenden Anzahl an Kolonien mit Hilfe einer Öse war kaum eine Rotfärbung und eine viel geringere Trübung zu erkennen. Eine Rotfärbung und Trübung der Lösung ließ sich auch durch das Abschwemmen einer unbeimpften Agarplatte erreichen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Kolonien zur Antigengewinnung mit einer Öse abgenommen und dann in einem PP-Röhrchen in Aqua dest. bzw. PBS suspendiert.

#### IV.1.2.3 Waschvorgang

Bei vergleichender Beschichtung mit gewaschenem und ungewaschenem, beschalltem Antigen (je 10 µg/ml) zeigte sich, wie in **Tabelle 9** dargestellt, dass die OD-Werte der Hyperimmunseren auf gewaschenem Antigen viel geringer waren als auf ungewaschenem Antigen.

**Tabelle 9 Vergleich der OD-Werte von gewaschenem und nicht gewaschenem Beschichtungs-Antigen (C.jej.) unter Verwendung von Schlachtseren der immunisierten Schweine 4 und 5 in unterschiedlichen Verdünnungen**

OD-Werte einer C.jej. Beschichtung				
Serumverdün- nung der Schlachtseren	Antigen gewaschen		Antigen ungewaschen	
	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 4	Schwein 5
1:50	0,438	0,606	2,741	1,710
1:100	0,198	0,364	2,094	1,303
1:200	0,179	0,217	1,603	0,834
1:400	0,049	0,097	0,949	0,642
1:800	0,036	0,062	0,593	0,336

### IV.1.3 Antigenfragmentierung

#### IV.1.3.1 Beschallung

Es zeigte sich, dass ein Volumen von 5 ml ungefähr 2 x 15 Minuten mit ca. 70 Watt beschallt werden musste, um ein gutes Beschallungsergebnis(>90% fragmentierte Bakterien) zu erhalten. Die Reinheitskontrolle der Sonikate mittels Kultivierung auf Blut- und Gassnerplatten war meist negativ. (Kontaminierte Antigenpräparationen wurden von der weiteren Verwendung ausgeschlossen.)

In der **Tabelle 10** werden vergleichend die OD-Werte der von 1:50 bis 1:6400 titrierten Schlachtseren der immunisierten Schweine, auf beschalltem und unbeschalltem C.jej. Antigen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass Beschichtungen mit beschalltem Antigen (je 10 µg Protein / ml Suspension) im Gegensatz zu nicht beschalltem um ein Vielfaches höhere OD-Werte ergaben. Sowohl die Feld- als auch die Schlachtseren der Versuchsschweine zeigten bei nicht beschalltem Antigen niedrige OD-Werte, die bei der Titration der Seren sehr schnell abfielen.

**Tabelle 10 Vergleich der OD-Werte bei verschiedenen Serumverdünnungen nach Antigenbeschichtung mit beschalltem und unbeschalltem C.jej.-Antigen bei jeweils 3 mit C.c. (Schwein 1-3) und mit C.jej. (Schwein 4-6) parenteral immunisierten Schweinen**

	OD-Werte mit C.c. Antiseren					
Serumver- dünnung	beschallt	unbeschallt	beschallt	unbeschallt	beschallt	unbeschallt
	Schwein 1	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 3
1:50	2,166	0,373	2,186	0,592	2,372	0,462
1:100	1,681	0,256	2,073	0,340	2,263	0,351
1:200	1,267	0,201	1,880	0,276	1,906	0,243
1:400	0,816	0,104	1,274	0,159	1,209	0,176
1:800	0,548	0,077	0,849	0,125	0,906	0,102
1:1600	0,212	0,047	0,541	0,060	0,554	0,060
1:3200	0,238	0,026	0,340	0,038	0,332	0,036
1:6400	0,044	0,017	0,159	0,021	0,214	0,023
	OD-Werte mit C.jej. Antiseren					
	beschallt	unbeschallt	beschallt	unbeschallt	beschallt	unbeschallt
	Schwein 4	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 5	Schwein 6	Schwein 6
1:50	2,287	0,455	2,586	0,713	2,177	0,450
1:100	2,074	0,264	2,623	0,539	1,824	0,292
1:200	1,805	0,219	2,541	0,498	1,174	0,227
1:400	1,112	0,140	2,132	0,368	0,938	0,214
1:800	0,860	0,100	1,902	0,336	0,647	0,093
1:1600	0,538	0,050	1,335	0,172	0,439	0,059
1:3200	0,257	0,028	0,699	0,112	0,197	0,035
1:6400	0,102	0,019	0,374	0,055	0,114	0,025

#### IV.1.3.2 Präparation von Campylobacter-Flagellin

Die vergleichende Beschichtung mit je 10 µg Protein / ml Suspension des Bakterienpellets und des Überstandes nach der Zentrifugation bei 10 000 x g, zeigte, wie in **Tabelle 11** dargestellt, für das Bakterienpellet niedrige OD-Werte. Hohe OD-Werte konnten bei dem vergleichenden Einsatz derselben Seren auf einer mit dem

Überstand beschichteten Platte gemessen werden. Im Vergleich zu dem C.-Sonikat lagen die OD-Werte des Überstandes höher.

**Tabelle 11 Vergleich der OD-Werte von Schlachtseren der immunisierten Schweine 4 und 5 in unterschiedlichen Verdünnungen von unterschiedlichen C.jej.-Antigenpräparationen**

Serum- verdünnun g	OD-Werte einer Plattenbeschichtung mit:					
	C. jej. beschallt		C. jej. Flagellin		Pellet nach Zentrifugation	
	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 4	Schwein 5
1:50	2,898	2,341	3,353	2,584	0,336	0,340
1:100	2,674	2,322	3,212	2,123	0,275	0,235
1:200	2,449	1,804	3,081	1,602	0,229	0,220
1:400	1,747	1,198	2,727	1,262	0,145	0,151
1:800	1,049	0,569	2,211	0,664	0,092	0,101

#### IV.1.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen nach LOWRY et al. (1951) und mittels Biuretreaktion (Merckotest®) erwiesen sich als ungeeignet zur Bestimmung der Antigen-Proteinmenge. Diese beiden Tests ergaben zwar bei dem Einsatz eines reinen BSA-Standards genaue Ergebnisse - die heterogene Antigensuspension bewirkte aber nur eine geringe Farbentwicklung, was zu deutlich niedrigeren Extinktionswerten führte als bei der rein photometrischen Messung ohne Farbreaktion.

Die Ergebnisse der rein photometrischen Proteinbestimmung ohne Reagenzien zeigten, dass eine visuelle Dichte der Suspension von etwa McFarland Nr. 2-3 vorliegen musste, um eine Bestimmung durchführen zu können. Die Messungen und Berechnungen von standardisierten Lösungen mit BSA ergaben bei jeder Verdünnung sehr genaue Ergebnisse. Daher wurde die photometrische Messung bei 3 Wellenlängen (260nm, 280nm und 320nm) zur Proteinbestimmung der Antigenpräparationen (McFarland 2-3) herangezogen.

Die von unbeimpften Col A- und Col B- Nährböden abgeschwemmten Lösungen erreichten, wie schon makroskopisch durch die Trübung und Rotfärbung zu erwarten war, hohe Absorptionswerte.

### **IV.1.5 Antigenbeschichtung**

#### **IV.1.5.1 Auswahl der Mikrotiterplatten**

Die OD-Werte von Feldproben lagen auf den MaxiSorp™-Platten sehr hoch (>3,0) und zwar weitgehend unabhängig von den unterschiedlichen Antigenkonzentrationen und Serumverdünnungen. Aber auch die nur mit MMP (ohne Antikörper) pipettierten Vertiefungen zeigten auf den MaxiSorp™-Platten hohe OD-Werte. Demgegenüber zeigten die PolySorp™-Platten gut abgestufte OD-Werte je nach verwendeter Antigenkonzentration und eingesetzter Serumverdünnung; die nur mit MMP pipettierten Vertiefungen ergaben sehr niedrige OD-Werte. Daher wurden für alle folgenden Untersuchungen PolySorp™-Platten beschichtet.

#### **IV.1.5.2 Antigenkonzentration für die Beschichtung**

Eine Antigenkonzentration von 10 µg Protein / ml Suspension war bei der Verwendung von nur einem Antigen ausreichend, um bei „positiven“ Seren aussagekräftige OD-Werte zu erhalten. Wurde die Antigenkonzentration höher gewählt, so zeigten auch „negative“ Seren höhere OD-Werte. Bestand das Antigen für die Beschichtung aus einer C.c.- und C.jej.- Mischung, war eine Gesamtkonzentration von 10 µg Protein pro ml Suspension ausreichend.

#### **IV.1.5.3 Auswahl des Beschichtungspuffers**

Die Beschichtung des Antigens mit Hilfe von Carbonatpuffer oder PBS zeigte im Vergleich zu nur mit CP bzw. nur mit PBS pipettierten Vertiefungen etwa doppelt so hohe OD-Werte. In **Tabelle 12** sind Ergebnisse einer Beschichtung der Platte mit Antigen in PBS, Carbonatpuffer und A. dest. vergleichend zu den jeweils nur mit PBS, Carbonatpuffer und A. dest. pipettierten Kavitäten dargestellt.

Lagen z.B. die OD-Werte einer Serumverdünnung von 1:200 auf einer Antigen-Carbonat-Beschichtung bei 1,313, so zeigte die entsprechende, nur mit Carbonatpuffer pipettierte Kavität einen OD-Wert von 0,651. Bei einer Beschichtung der Platte mit Antigen in A. dest. waren im Vergleich zu den nur mit A. dest. pipettierten Vertiefungen deutliche Unterschiede in den OD-Werten zu erkennen. Eine Serumverdünnung von 1:200 zeigte z.B. auf mit Antigen in A. dest. beschichteten Platten einen OD-Wert von 1,243, wohingegen der OD-Wert auf der nur mit A. dest. pipettierten Kavität 0,093 betrug.

**Tabelle 12 Vergleich der OD-Werte nach Beschichtung der Platte mit in Carbonat-Puffer, PBS oder A. dest. suspendiertem Antigen und nur mit Suspensionsflüssigkeit pipettierten Kavitäten bei einer Serumverdünnung von 1:200**

Seren Nr.	OD- Werte bei Beschichtung mit :	
	Ag + CP	nur CP
1	1,313	0,651
2	1,458	0,769
3	1,070	0,563
	Ag + PBS	nur PBS
4	1,415	0,528
5	0,824	0,280
6	0,459	0,135
	Ag + A. dest.	nur A. dest.
7	1,015	0,085
8	1,137	0,047
9	1,139	0,125

#### IV.1.5.4 Unterschiedliche Beschichtungsbedingungen

Beschichtete Mikrotiterplatten, ob mit Antigen oder mit MMP (Blockpuffer) eingefroren, benötigten mindestens 48 h, bis alle Vertiefungen gleichmäßig

durchgefroren waren. Mikrotiterplatten, die bei Raumtemperatur inkubierten und danach mit MMP eingefroren worden waren, zeigten im Vergleich zu den mit Antigen eingefrorenen Platten, sehr niedrige OD-Werte. Vergleichend zu den beschichteten, nicht eingefrorenen Platten betrachtet, lagen die OD-Werte der Seren auf den gefrorenen Platten höher. Sehr hohe OD-Werte der Positiv-, aber auch der Negativseren waren bei der Verwendung einer im Brutschrank eingetrockneten Beschichtung festzustellen. Die Unterscheidung zwischen hohen und niedrigen OD-Werten war praktisch unmöglich, weshalb diese Methode nicht weiter verfolgt wurde.

### **IV.1.6 Auswahl der Waschlösung und des Block- und Verdünnungspuffers**

Die OD-Werte der mit PBS-Waschlösung gewaschenen und mit PBS/5% MMP geblockten Kavitäten zeigten eine deutlichere Differenz zwischen beschichteten und nicht beschichteten Kavitäten, als die OD-Werte der mit PBS/3%BSA gewaschenen und geblockten Vertiefungen. Bei der Verwendung von PBS/3%BSA waren die OD-Werte des positiven Serums niedriger und die des negativen Serums höher, als dieselben Seren bei der Verwendung von PBS-Waschlösung und PBS/5%MMP als Block- und Verdünnungspuffer. Wurden die Platten mit PBS/5%MMP ohne Zusatz von Tween geblockt, konnte eine Reduktion der unspezifischen Bindungen festgestellt werden.

Dreimaliges Waschen nach dem Blocken der beschichteten Platte, führte im Gegensatz zu der nicht gewaschenen, zu höheren OD-Werten der positiven, bzw. zu niedrigeren OD-Werten der negativen Proben und wurde daher generell durchgeführt

### **IV.1.7 Verdünnung der Proben**

Verdünnungen der Feldseren von 1:100 und 1:400 (**Tabellen 66 bis 80**), bzw. der Fleischsaftproben von 1:30 und 1:100 (**Tabellen 81 bis 90**) zeigten gute Ergebnisse zur Verwendung für eine Einteilung der Proben in einen niedrigen, mittleren und hohen OD-Bereich (IV.7 und IV.8).

PP-Verdünnungsplatten waren ebenso für die Verdünnung und Titrierung der Proben geeignet, wie PolySorp<sup>TM</sup>-Platten.

#### **IV.1.8 Verwendung des Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Schwein Konjugates**

Eine unspezifische Bindung des Konjugates wurde durch das Mitführen von Antigenbeschichteten wells, die nach dem Blocken nur mit MMP (ohne Antikörper) inkubiert wurden, überprüft. Starke unspezifische Bindungen des Konjugates konnten bei der Verwendung von Carbonatpuffer für die Antigenbeschichtung festgestellt werden. Diese ließen sich auch durch Erhöhung der Verdünnung oder die Präinkubation des Konjugates mit dem Antigen nicht senken. Keinerlei unspezifische Konjugatreaktionen konnten dagegen bei einer Antigenbeschichtung mit PBS und mit A. dest. festgestellt werden. Geeignete Konjugatverdünnungen im Rahmen der Voruntersuchungen lagen bei der Verwendung von Serum im Bereich von 1: 5000 bis 1 : 15000 und bei der Verwendung von Fleischsaft bei 1: 2500 bis 1: 10000.

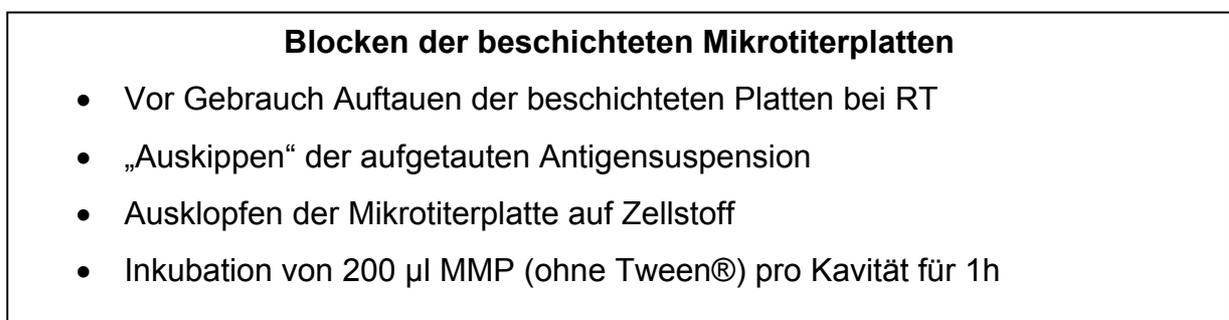
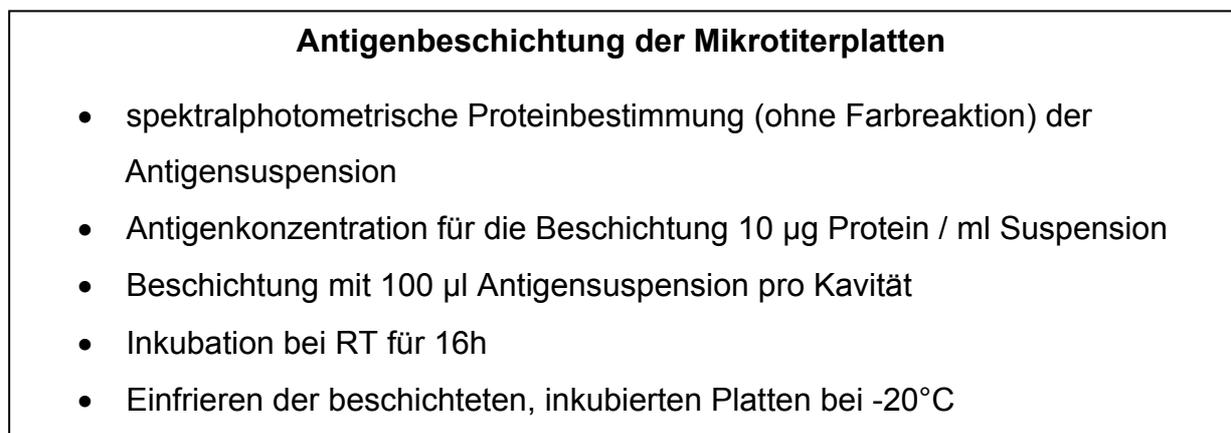
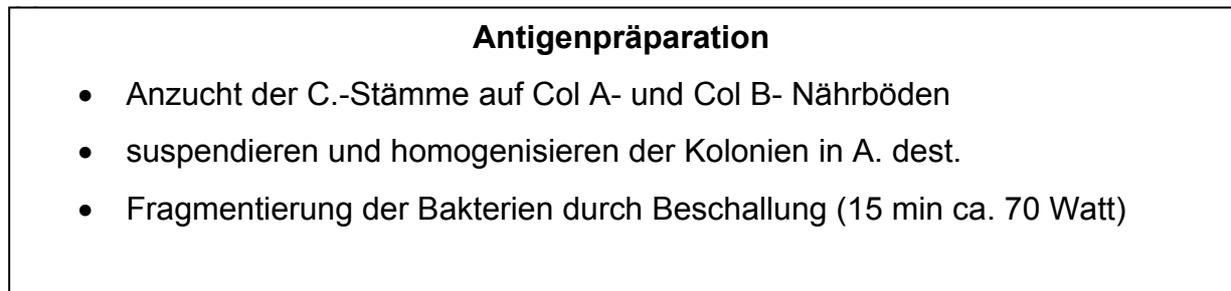
#### **IV.2 ELISA- Ablauf**

Folgendes in **Abbildung 6** schematisch dargestelltes endgültiges ELISA-Testsystem wurde aufgrund der zahlreichen Voruntersuchungen und der dabei gewonnenen Erkenntnisse festgelegt.

Als Festphase wurden 96-Loch PolySorp<sup>TM</sup>-Mikrotiterplatten verwendet. Unter den thermophilen C.-Stämmen wurden der C.c. Feldstamm B 243 und der C.jej. CCUG-Stamm als Bakterienstämme für die Antigenherstellung ausgewählt. Angezüchtet wurden die Bakterien auf Col A- und Col B- Nährböden, die mikroaerophil (4,5 % O<sub>2</sub>, 15 % CO<sub>2</sub>, 80,5 % N<sub>2</sub>) vier Tage bei 37°C bebrütet wurden. Mit Ösen wurden die Kolonien von den Nährböden abgenommen und in Handhomogenisatoren in 5 ml A. dest. suspendiert. Ohne zu waschen wurde die jeweilige Suspension im Eiswasserbad mittels Ultraschall so lange beschallt (15 Minuten, ca. 70 Watt), bis mikroskopisch etwa 90% der Bakterien als Bruchstücke vorlagen. Die beschallte Suspension wurde auf eine Trübung nach McFarland Nr. 2-3 eingestellt. Die Antigen suspension wurde nach photometrischer Proteinbestimmung in 2,0 ml Reaktionsgefäßen abgefüllt und bei -20°C gelagert. Zur Beschichtung wurde das Antigen aufgetaut und mit A. dest. auf eine Konzentration von 10 µg Protein pro ml

Suspension eingestellt. Als Antigen wurde C.c., C.jej. und eine Kombination der beiden, mit je 5 µg Protein pro ml Suspension verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl der gebrauchsfertigen Antigensuspension pro Kavität, 16 h bei RT beschichtet und anschließend nach dem Verschluss mit Abdeckfolien bei -20°C gelagert. Gleichmäßiges Auftauen der Platten erfolgte bei RT, indem die Platten zur besseren Kälteverteilung auf Reagenzglashalter gestellt wurden. Die vollständig aufgetaute Antigensuspension wurde abgekippt, die Platte auf Zellstoff ausgeklopft und jede Kavität mit 200 µl MMP ohne Tween® für eine Stunde bei RT geblockt. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit 200 µl PBS- Waschlösung pro Kavität und das Auftragen der Proben als Einfachansatz in 1:30, 1:100 und 1:400 Verdünnung. Als Vergleichsmaßstab zur Bewertung der Probenergebnisse wurde eine abgekürzte Titration eines positiven Kontrollserums mitgeführt. Das Pipettieren und Verdünnen der Seren und des Fleischsaftes wurde manuell oder mit Hilfe eines automatischen Probenverteilers durchgeführt. Die Proben inkubierten eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttelgerät, wurden anschließend ausgekippt und die Platten dreimal gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl des 1:5 000 in MMP verdünnten Konjugates pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Auskippen des Konjugates und fünfmaligem Waschen der Platten, inkubierten 100 µl Substrat (TMB) pro Kavität unter Lichtabschluss für 15 min. Die Reaktion wurde mit 100 µl einer 1 N Schwefelsäure pro Kavität gestoppt. Ein Plattenschüttler mischte Substrat und Stopplösung, bevor im ELISA-Reader bei einer Meßwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm die Extinktionen der Proben bestimmt wurden.

**Abbildung 6 Schematische Darstellung des ELISA-Ablaufs**

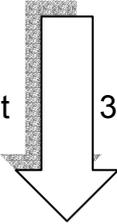


Dreimaliges Waschen mit 300 µl PBS-Waschlösung pro Kavität

## Fortsetzung Abbildung 6

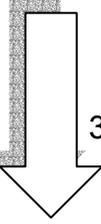
### Probeninkubation

- Verdünnung der Proben in MMP (mit Tween®)
- Pipettieren von 100 µl der verdünnten Proben pro Kavität
- Inkubation der Proben für 1h bei 37°C auf einem Schüttelgerät

Dreimaliges Waschen mit  300 µl PBS-Waschlösung pro Kavität

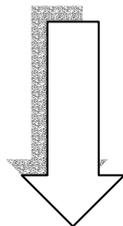
### Konjugatinkubation

- Konjugat 1:5000 in MMP (mit Tween®) verdünnen
- Je 100 µl verdünntes Konjugat in die Vertiefungen pipettieren
- Inkubation 1h bei RT

Fünfmaliges Waschen mit  300 µl PBS-Waschlösung pro Kavität

### Substratreaktion

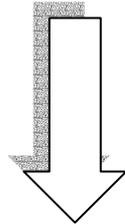
- 100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren
- Inkubation (abgedunkelt) 15 min bei RT



### Fortsetzung Abbildung 6

#### Stoppen der Reaktion

- 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren



#### Messung der Farbreaktion

- Messung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm

### IV.3 Plattenhomogenität

Um die Homogenität der Beschichtung zu überprüfen, wurden wie in **Tabelle 91** (im Anhang) dargestellt alle Vertiefungen einer Platte mit einer konstanten Serumverdünnung inkubiert.

Das Inkubieren einer mit C.jej., C.c. und C.c./C.jej. (Mix) beschichteten Mikrotiterplatte mit je einer Serumverdünnung im beurteilungsrelevanten OD-Bereich von 1,2 bis 1,3 führte zu folgenden Variationskoeffizienten der optischen Dichten:

- C.jej. beschichtete Platte: bei OD  $\bar{x}$  : 1,24, Variationskoeffizient 10,3%,
- C.c. beschichtete Platte: bei OD  $\bar{x}$  : 1,31, Variationskoeffizient 8,6 %,
- Mix (C.c./C.jej.) beschichtete Platte: im  $\bar{x}$  :1,26, Variationskoeffizient 8,3%,

#### **IV.4 Verwendung von weiteren *Campylobacter* Stämmen zur Überprüfung von Kreuzreaktivitäten der Hyperimmun- und Feldseren**

Wie in **Tabelle 13** und in **Tabelle 14** dargestellt, konnten bei den 1:100 und 1:400 verdünnten Hyperimmunseren (4/1-6) auf den mit *C. lari* beschichteten Platten teilweise gleich hohe OD-Werte ( $>2,0$ ) wie auf den mit *C.c.*, *C.jej.* oder einer Mischung der beiden (Mix) beschichteten Platten gemessen werden. Dies war vor allem bei den mit *C.jej.* immunisierten Schweinen (4/4-6) festzustellen. Vergleichbar wenn auch in geringerem Umfang reagierten diese Seren auf mit den Deckseuchenerregern *C. fetus ssp. venerealis* und *C. fetus ssp. fetus* beschichteten Platten (OD-Werte bis 1,256). Bei den Seren der mit *C.jej.* immunisierten Schweine konnten auf den mit *C. fetus ssp. venerealis* beschichteten Platten höhere OD-Werte (0,870 bis 1,256) als auf den mit *C. fetus ssp. fetus* beschichteten (OD-Werte 0,617 bis 0,804) verzeichnet werden.

Seren der Impfschweine vor der Immunisierung (0/1-6) in einer 1:400 Verdünnung, ebenso wie die untersuchten Ferkelseren (F) zeigten auf mit *C. lari*, *C. fetus ssp. venerealis* und *C. fetus ssp. fetus* beschichteten Platten sehr niedrige OD-Werte ( $<0,297$ ).

Die 20 getesteten Feldserumproben aus 2 Einsendungen (SE1 und SE 2) ließen auf den mit *C. lari* beschichteten Platten meist niedrigere OD-Werte als auf den mit *C.c./C.jej.* (Mix) beschichteten Platten erkennen. In 6 Fällen waren die jeweils gemessenen OD-Werte annähernd gleich hoch, wohingegen die 1:400 verdünnten Feldserumproben auf den mit *C. fetus ssp. venerealis* und *C. fetus ssp. fetus* beschichteten Platten im Vergleich zu den mit *C.c.*, *C.jej.* und *C.c./C.jej.* (Mix) beschichteten Platten nur sehr niedrige OD-Werte bis maximal 0,360 aufwiesen.

**Tabelle 13 Vergleich der OD-Werte von 1:100 verdünnten Hyperimmunseren (4/1-6), Seren der Impfschweine vor der Immunisierung (0/1-6), Ferkelseren (F) und Feldserumproben (SE 1 und 2) auf je einer mit C.c., C.jej., C.c./C.jej. (Mix), C. lari, C. fetus ssp. venerealis und C. fetus ssp. fetus beschichteten Platte**

Serum	OD-Werte 1:100 verdünnter Seren auf einer Beschichtung mit:					
	C.c.	C.jej.	Mix	C.lari	C.venerealis	C.fetus
4/1	3,313	2,857	2,986	1,200	0,583	0,513
4/2	3,213	3,007	3,326	1,392	0,515	0,554
4/3	3,430	3,283	3,137	1,552	0,898	0,668
4/4	2,866	2,821	2,895	2,955	1,256	0,804
4/5	3,073	2,746	3,144	3,087	1,048	0,737
4/6	2,590	2,910	2,761	2,388	0,870	0,617
0/1	1,012	0,958	1,367	1,022	0,419	0,250
0/2	0,776	0,947	0,903	0,557	0,302	0,165
0/3	0,981	1,070	0,759	0,368	0,183	0,153
0/4	0,727	1,070	1,127	0,425	0,459	0,239
0/5	0,921	1,188	1,037	0,457	0,431	0,199
0/6	0,657	0,662	0,791	0,327	0,278	0,133
F/1	0,349	0,260	0,230	0,091	0,069	0,088
F/2	0,554	0,532	0,422	0,204	0,174	0,104
F/3	0,374	0,356	0,416	0,139	0,061	0,058
F/4	0,383	0,345	0,227	0,117	0,051	0,045
F/5	0,519	0,768	0,454	0,219	0,159	0,167
F/6	0,234	0,213	0,172	0,111	0,151	0,152
SE1/1	0,777	1,079	0,721	0,521	0,377	0,278
SE1/2	0,748	0,666	0,676	0,441	0,287	0,195
SE1/3	1,508	1,075	1,207	0,593	0,443	0,240
SE1/4	0,942	0,778	0,802	0,438	0,304	0,124
SE1/5	1,076	1,101	1,219	0,623	0,547	0,281
SE1/6	1,107	0,875	1,039	0,583	0,332	0,283
SE1/7	0,893	1,366	0,988	0,822	0,395	0,421
SE1/8	1,096	1,079	1,521	0,695	0,534	0,372
SE1/9	0,659	1,237	0,757	0,869	0,274	0,207
SE1/10	0,992	0,747	0,906	0,404	0,410	0,202
SE2/1	0,720	0,570	1,030	0,295	0,268	0,161
SE2/2	0,573	0,662	0,503	0,378	0,482	0,255
SE2/3	0,681	0,840	0,688	0,294	0,101	0,158
SE2/4	1,035	1,099	1,404	0,501	0,322	0,219
SE2/5	1,052	1,095	1,032	0,531	0,393	0,181
SE2/6	0,651	0,949	0,883	0,503	0,356	0,152
SE2/7	0,777	0,875	1,041	0,381	0,417	0,248
SE2/8	0,726	0,970	0,904	0,412	0,319	0,146
SE2/9	0,875	0,950	0,961	0,417	0,359	0,232
SE2/10	0,763	0,748	1,109	0,471	0,265	0,185

**Tabelle 14 Vergleich der OD-Werte von 1:400 verdünnten Hyperimmunseren (4/1-6), Seren der Impfschweine vor der Immunisierung (0/1-6), Ferkelseren (F) und Feldserumproben (SE 1 und 2) auf je einer mit C.c., C.jej., C.c./C.jej. (Mix), C. lari, C. fetus ssp. venerealis und C. fetus ssp. fetus beschichteten Platte**

Seren	OD-Werte 1:400 verdünnter Seren auf einer Beschichtung mit:					
	C.c.	C.jej.	Mix	C.lari	C.venerealis	C.fetus
4/1	2,327	2,187	2,522	0,673	0,286	0,315
4/2	2,340	2,691	2,874	0,786	0,340	0,193
4/3	2,980	2,889	2,894	1,100	0,420	0,283
4/4	2,442	2,207	2,500	3,015	0,732	0,461
4/5	2,670	2,526	2,873	2,455	0,643	0,458
4/6	2,045	2,277	2,125	2,113	0,405	0,266
0/1	0,370	0,336	0,635	0,187	0,131	0,079
0/2	0,497	0,539	0,574	0,200	0,134	0,120
0/3	0,431	0,640	0,451	0,232	0,163	0,110
0/4	0,431	0,745	0,598	0,259	0,297	0,139
0/5	0,700	0,712	0,572	0,248	0,126	0,086
0/6	0,407	0,402	0,530	0,252	0,163	0,062
F/1	0,107	0,102	0,129	0,028	0,031	0,026
F/2	0,284	0,257	0,324	0,077	0,071	0,042
F/3	0,120	0,112	0,127	0,053	0,025	0,019
F/4	0,180	0,191	0,228	0,070	0,036	0,034
F/5	0,165	0,268	0,255	0,136	0,064	0,103
F/6	0,097	0,086	0,065	0,040	0,055	0,054
SE1/1	0,476	0,665	0,451	0,340	0,162	0,102
SE1/2	0,494	0,572	0,499	0,377	0,140	0,083
SE1/3	0,868	0,820	0,972	0,394	0,200	0,116
SE1/4	0,460	0,604	0,697	0,344	0,095	0,089
SE1/5	0,720	0,718	1,061	0,555	0,234	0,143
SE1/6	0,664	0,761	0,932	0,389	0,223	0,172
SE1/7	0,711	0,737	0,596	0,663	0,139	0,199
SE1/8	0,492	0,718	0,608	0,569	0,231	0,128
SE1/9	0,467	0,732	0,566	0,614	0,184	0,119
SE1/10	0,459	0,660	0,734	0,469	0,155	0,109
SE2/1	0,478	0,622	0,436	0,251	0,173	0,095
SE2/2	0,484	0,586	0,525	0,359	0,305	0,151
SE2/3	0,319	0,411	0,420	0,214	0,086	0,062
SE2/4	0,970	0,839	0,985	0,602	0,326	0,256
SE2/5	0,731	0,752	0,900	0,464	0,280	0,149
SE2/6	0,470	0,492	0,666	0,435	0,262	0,183
SE2/7	0,660	0,906	0,780	0,474	0,356	0,362
SE2/8	0,652	0,725	1,561	0,342	0,125	0,126
SE2/9	0,591	0,749	0,659	0,381	0,184	0,205
SE2/10	0,626	0,628	0,704	0,706	0,335	0,360

## **IV.5 Ergebnisse der Immunisierung**

### **IV.5.1 Allgemeine mikrobiologische Untersuchungen der Impfschweine**

Aus den Sammelkotproben, die zu Beginn der Immunisierung und bei der Schlachtung gewonnen wurden, konnte jeweils C.c. isoliert werden. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe des Api Campy unter IV.1.1.2 (**Tabelle 8**).

Die Untersuchung der Schlachtseren auf Antikörper gegen Europäische Schweinepest, Morbus Aujeszky, Porcine Parvovirose, PRSS (Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome) und Salmonellose ergaben ein negatives Ergebnis.

### **IV.5.2 Serologische Untersuchungsergebnisse der Serum- und Fleischsaftproben der immunisierten Schweine (Impfschweine)**

#### **IV.5.2.1 Serumergebnisse der Impfschweine**

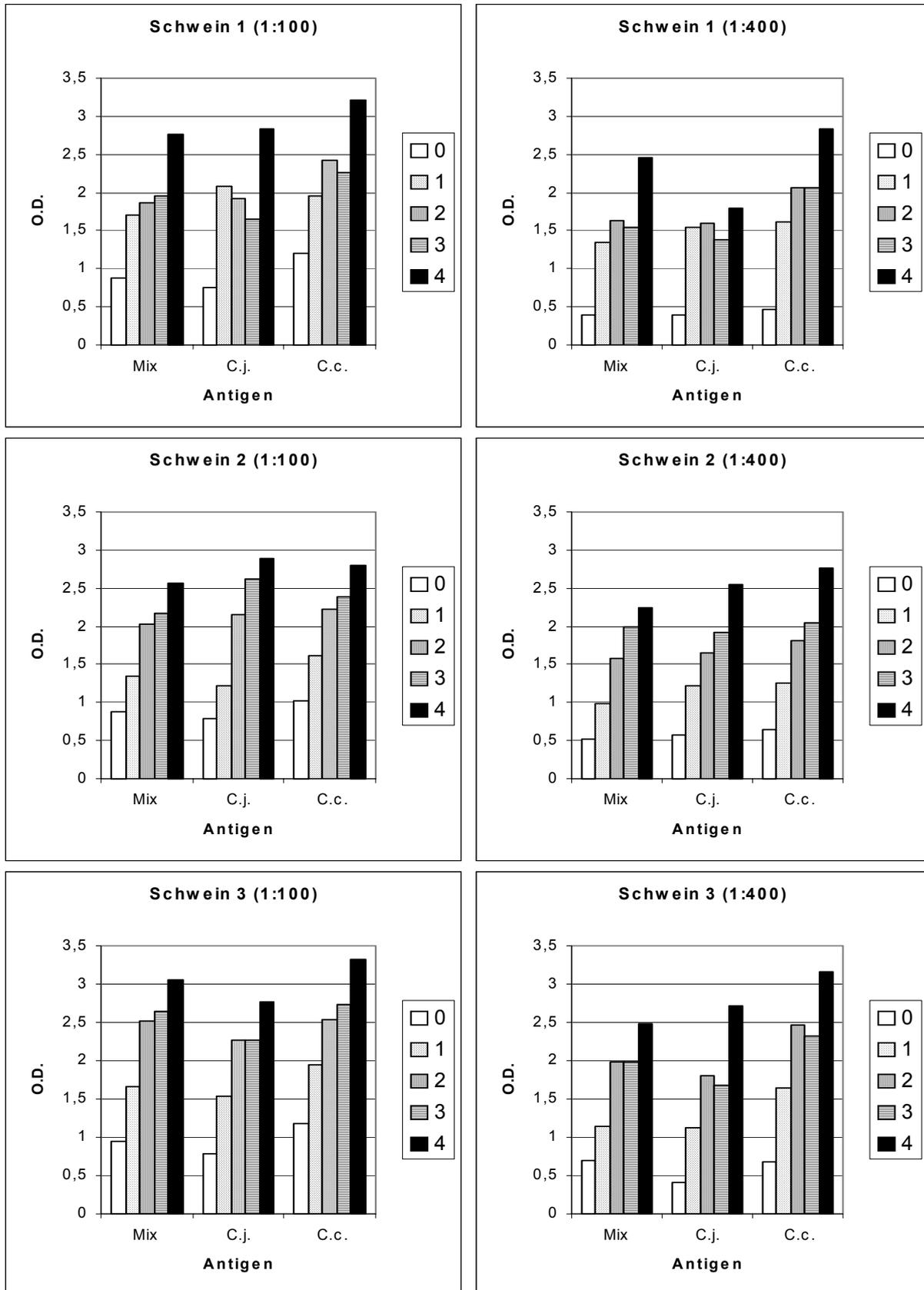
Das angewandete Immunisierungsschema mit drei Immunisierungen im Verlauf des Versuches führte wie in **Abbildungen 7 und 8** dargestellt, bei nahezu allen Impfschweinen zu einem kontinuierlichen Anstieg des C.-Antikörperspiegels (**Tabellen 30 bis 47**). Seren vor der Immunisierung sind mit 0 gekennzeichnet, die nachfolgend entnommenen Serumproben mit 1 bis 4.

Bei Schwein 6 kam es vor der dritten Immunisierung zu einem Abfall des Antikörperspiegels. Durch die Dritte Immunisierung stieg der Spiegel allerdings deutlich an. Die Untersuchung der Seren vor der ersten Immunisierung zeigten bei einer 1:400 Verdünnung OD-Werte, die bei allen Schweinen bei einer C. Mix Beschichtung in einem OD-Bereich von 0,4 bis 0,75 lagen. Die OD-Werte der Schlachtseren dieser Tiere lagen unter den gleichen Untersuchungsbedingungen in einem Bereich von 2,0 bis 2,7. Proben von mit C.c. bzw. mit C.jej. immunisierten Schweinen, zeigten wie in den **Abbildungen 7 und 8** und in den **Tabellen 30 bis 47** dargestellt, auf den homologen Antigenbeschichtungen meist höhere OD-Werte als auf der anderen (C.c. oder C.jej.) Beschichtung. Zusätzlich zeigen die beiden **Abbildungen 7 und 8** eine vergleichende Darstellung der C.-Antikörperentwicklungen der Impfschweine im Verlauf der Immunisierung bei einer 1:100 und 1:400 Verdünnung auf Mix (C.c./C.jej.) Beschichtungen.

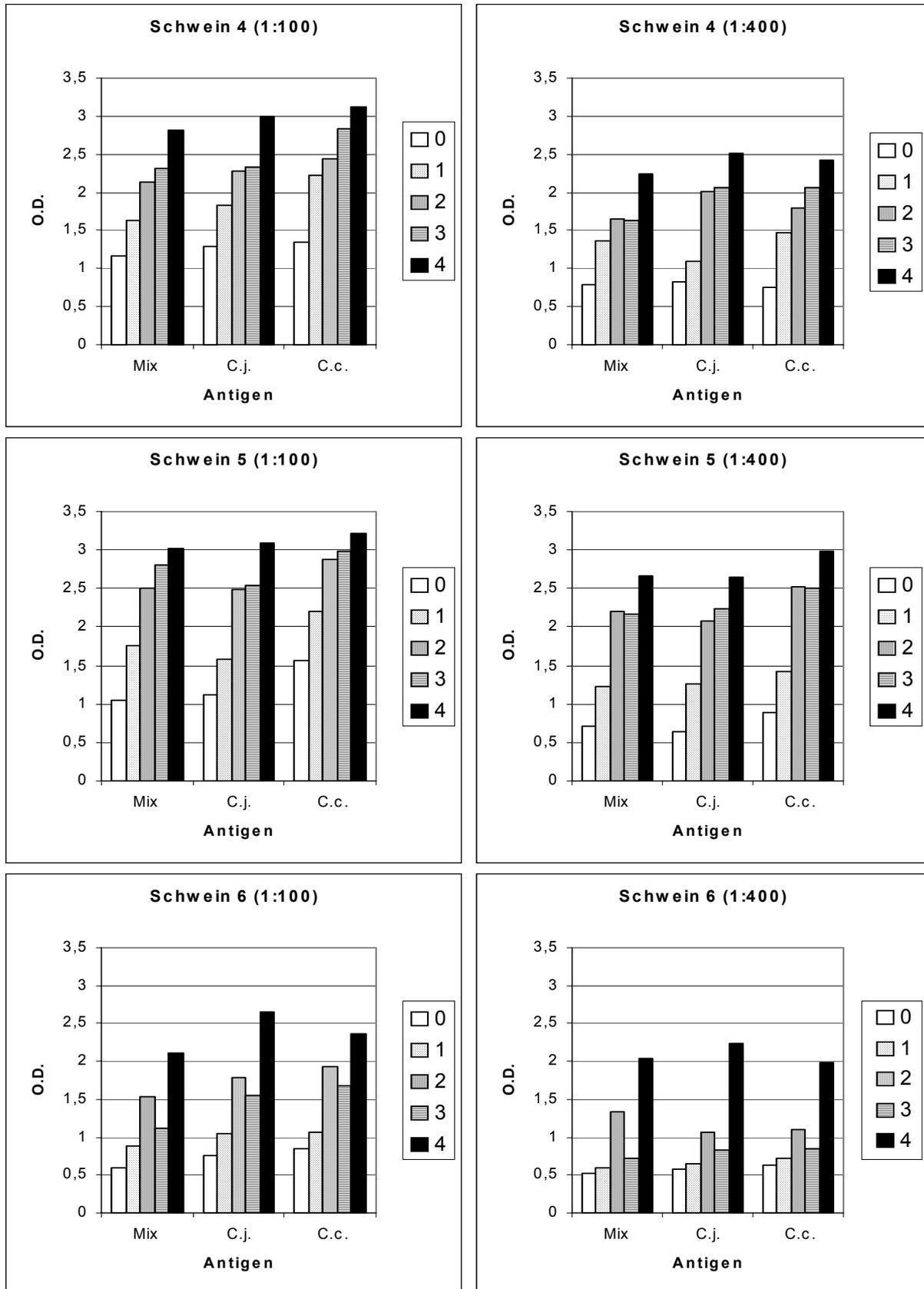
Die C.-Antikörperspiegel bei den mit C.c. und C.jej. immunisierten Schweinen wurden in den **Abbildungen 9 und 10** vergleichend vor der Immunisierung (Null) und bei der Schlachtung (Tod) bei Verwendung unterschiedlich beschichteter Platten und einer Verdünnung der Seren von  $\log_{10} 1,7$  bis  $\log_{10} 5,0$  dargestellt. In diesen Abbildungen ist das höhere Niveau der OD-Bereiche nach der letzten Immunisierung (Tod) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Null) zu erkennen. Die OD-Werte der Seren der mit C.c. immunisierten Schweine lagen im Vergleich zu den mit C.jej. immunisierten enger beieinander.

In den **Abbildungen 17 bis 22** (im Anhang) sind Verdünnungen von  $\log_{10} 1,7$  bis  $\log_{10} 5,0$  von Seren der Impfschweine vor der Immunisierung, nach der ersten, nach der zweiten, zwei Monate nach der zweiten und nach der dritten Immunisierung vergleichend auf C.c.-, C.jej.- und C.c./C.jej.-Mix-Beschichtungen dargestellt.

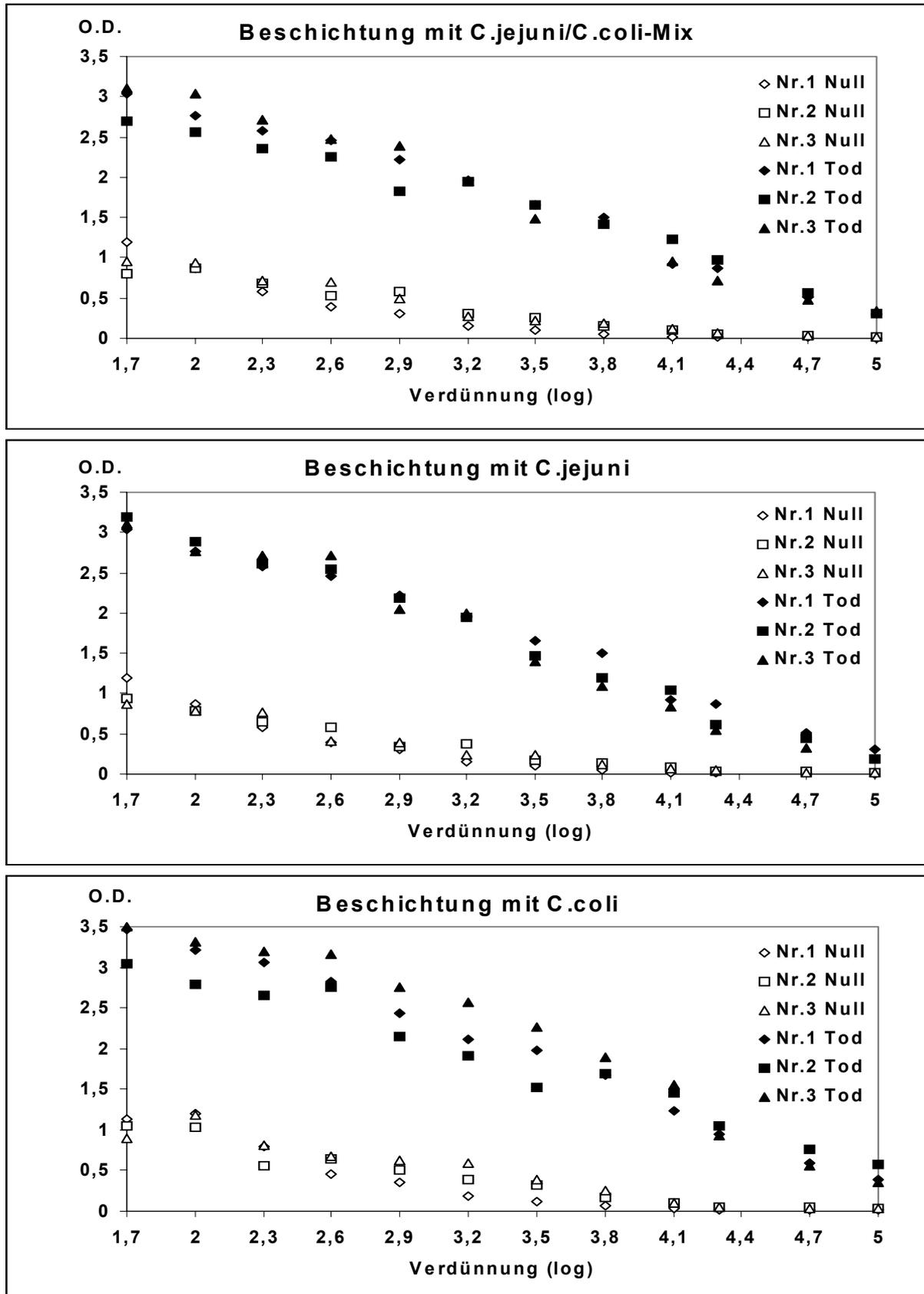
**Abbildung 7 Vergleichende Darstellung der C.-Antikörperentwicklungen der mit C.c. immunisierten Schweine bei einer Serumverdünnung von 1:100 und 1:400 auf je einer Mix-, C.c.- und C.j. Beschichtung**



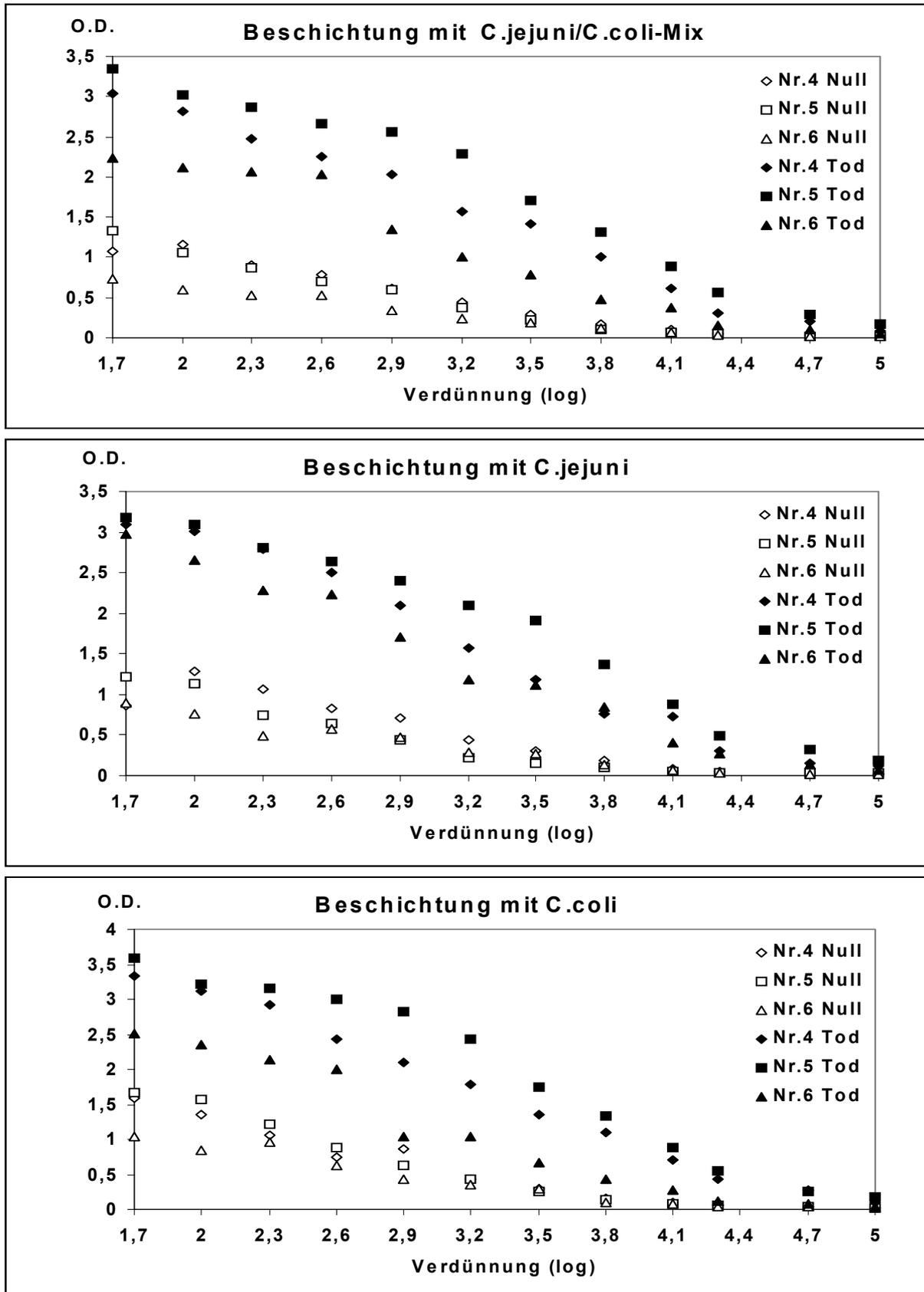
**Abbildung 8 Vergleichende Darstellung der C.-Antikörperentwicklungen der mit C.jej. immunisierten Schweine bei einer serumverdünnung von 1:100 und 1:400 auf einer Mix-, C.c.- und C.jej. Beschichtung**



**Abbildung 9 C.-Antikörperspiegel bei den mit C.c. immunisierten Schweinen vor der Immunisierung (Null) und bei der Schlachtung (Tod) bei Verwendung unterschiedlich beschichteter Platten**



**Abbildung 10 C.-Antikörperspiegel bei den mit C.jej. immunisierten Schweinen vor der Immunisierung (Null) und bei der Schlachtung (Tod) bei Verwendung unterschiedlich beschichteter Platten**



#### **IV.5.2.2 Fleischsaftergebnisse der Impfschweine**

Die Untersuchung des Fleischsaftes der immunisierten Schweine ergab z.B. bei einer 1:400 ( $\log_{10} 2,6$ ) Verdünnung auf C.Mix Platten OD-Werte zwischen 0,7 und 1,7. Proben von Schweinen, die mit C.c. immunisiert worden waren, zeigten auf den homologen Antigenbeschichtungen höhere OD-Werte als auf den nicht homologen (**Tabellen 48 bis 50**). Vergleichbares konnte bei den C.jej. Hyperimmunfleischsaftproben festgestellt werden (**Tabellen 51 bis 53**). In den **Abbildungen 11 bis 13** sind Ergebnisse von Fleischsaftproben und Schlachtseren der sechs Impfschweine, vergleichend auf je einer C.c., C.jej. und C.Mix-Beschichtung dargestellt. Die Proben wurden in Verdünnungen von  $\log_{10} 1,7$  bis  $\log_{10} 5,0$  titriert. Anhand der Grafiken ist erkennbar, dass Fleischsaftproben von einzelnen Impfschweinen (z.B. Schwein 6), deren Schlachtserum-OD-Werte im Vergleich zu den anderen Impfschweinen niedriger lagen, auch niedrigere Fleischsaft-OD-Werte aufwiesen.

**Abbildung 11 Titration des Fleischsaftes (FS) und der Schlachtseren (S) der Impfschweine 1-6 auf einer Platte mit Mix-Beschichtung (C.c./C.jej.)**

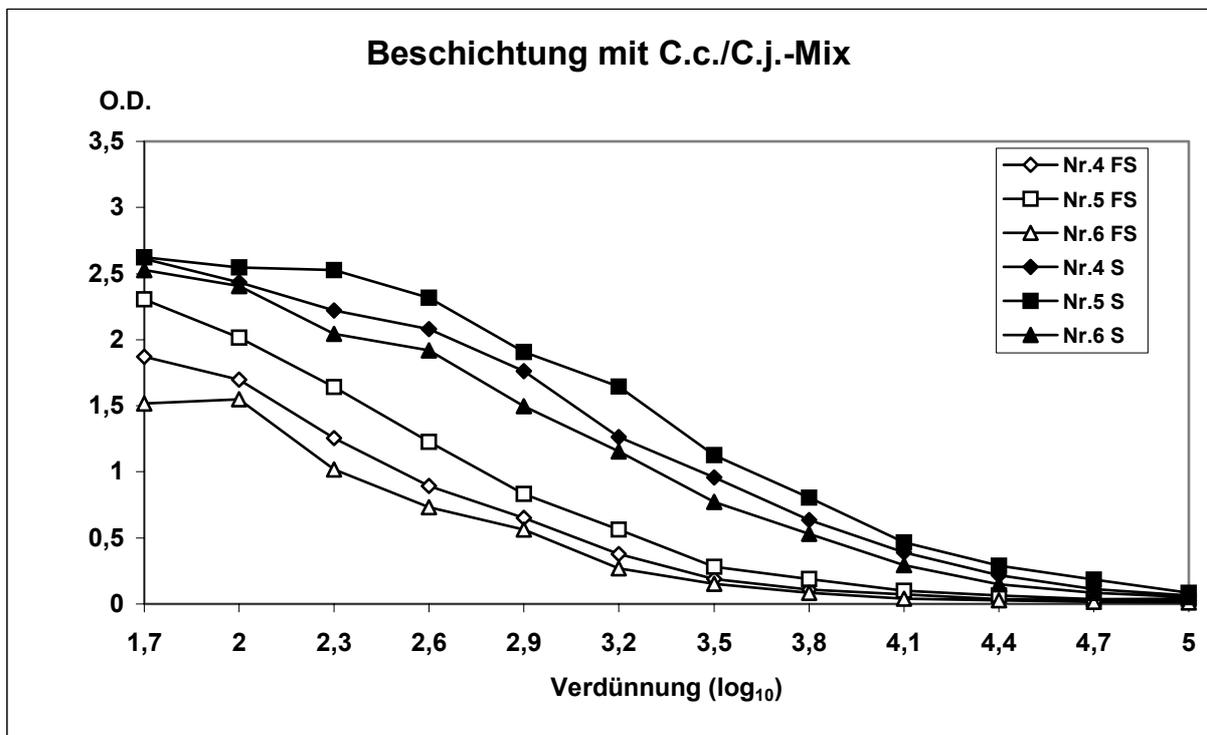
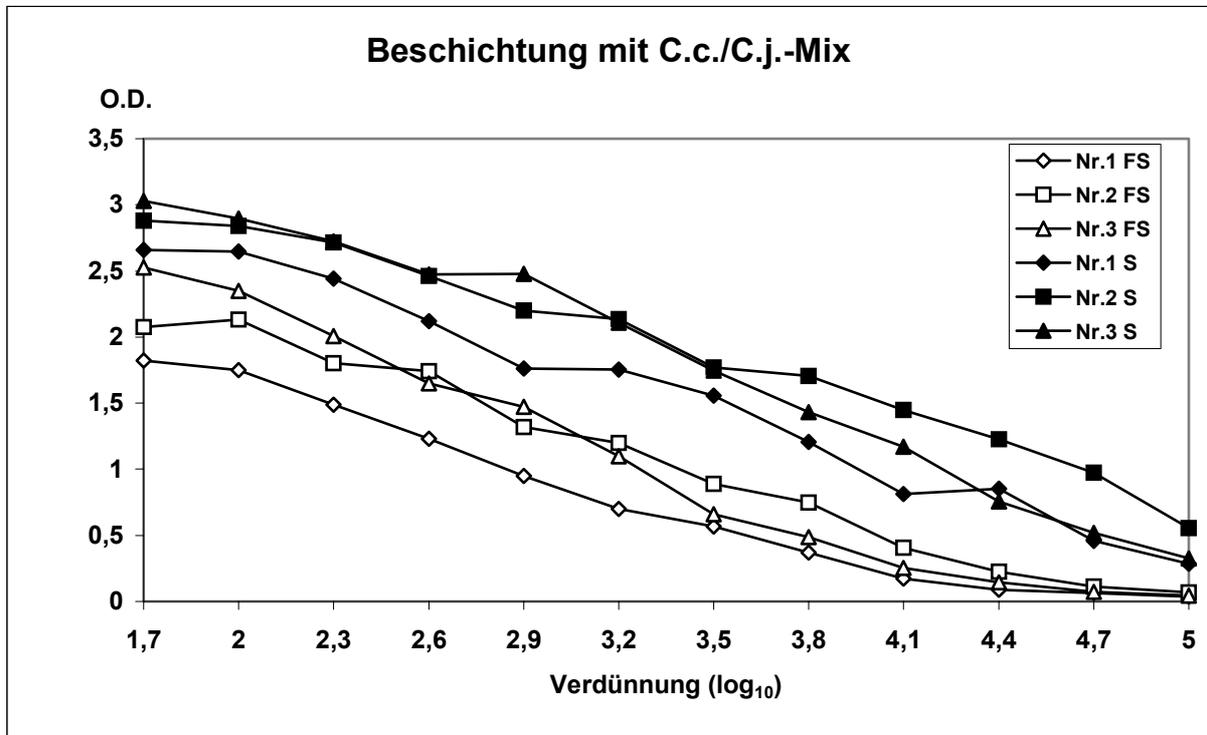
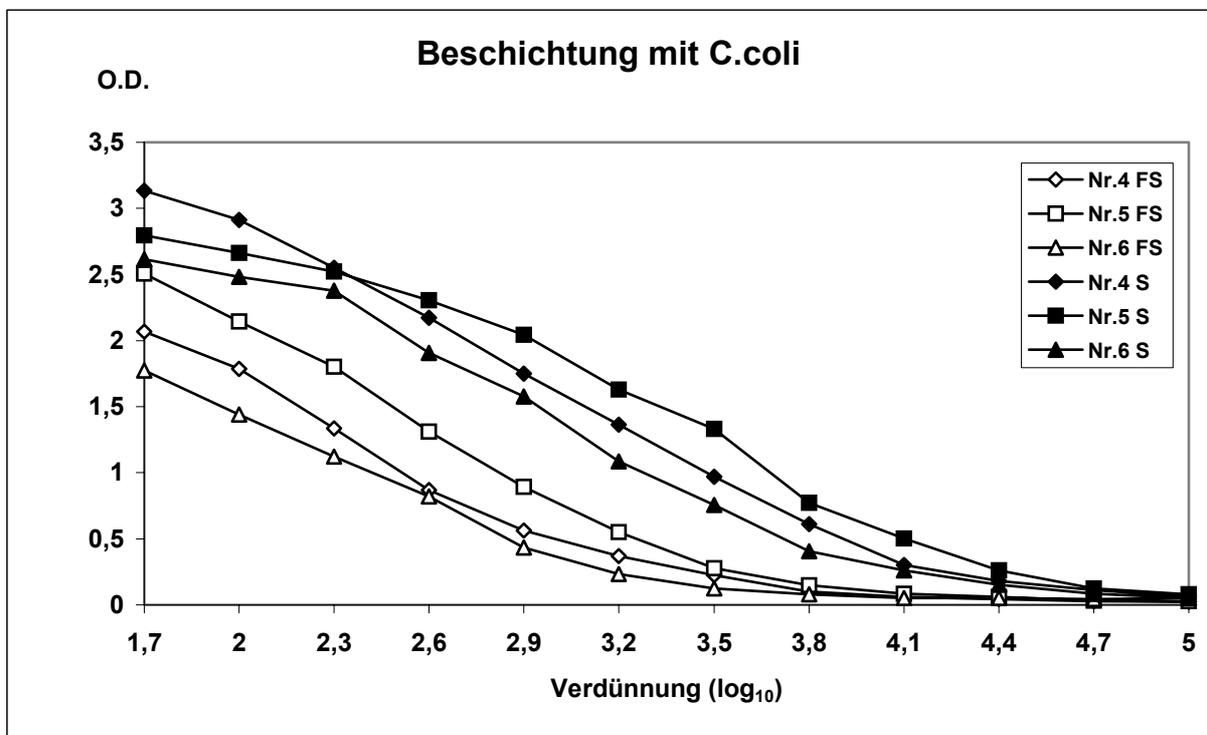
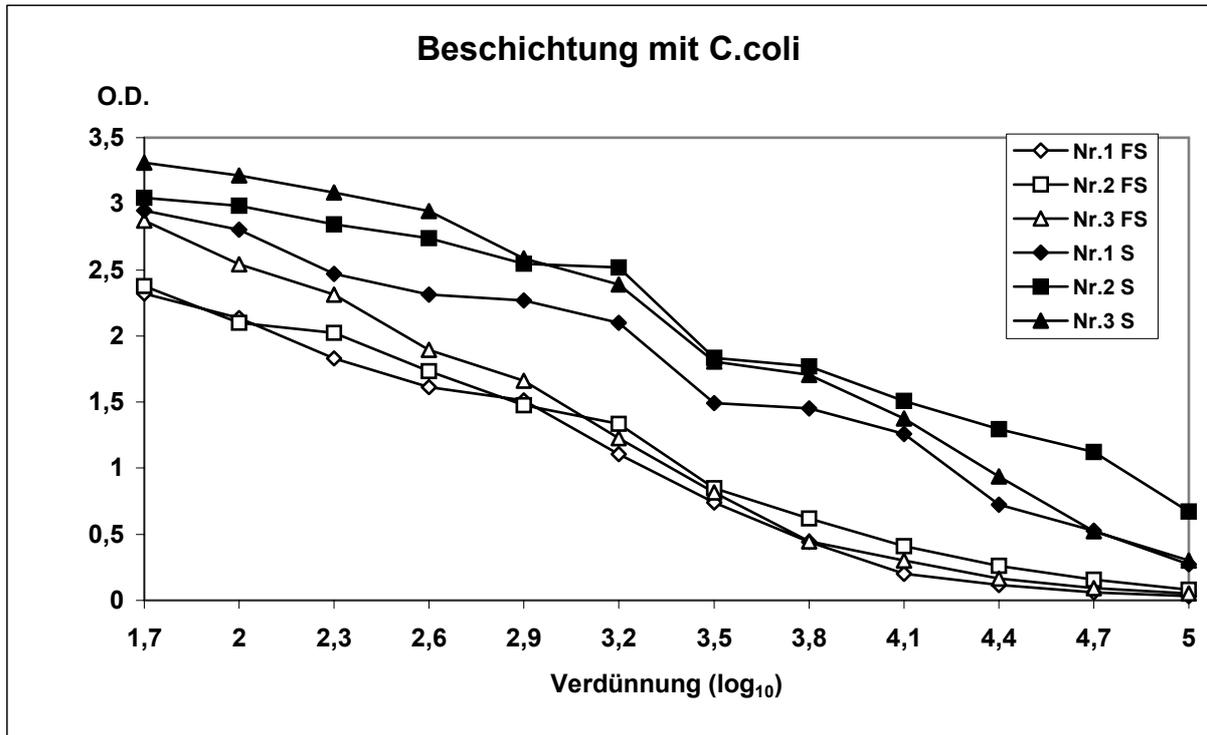
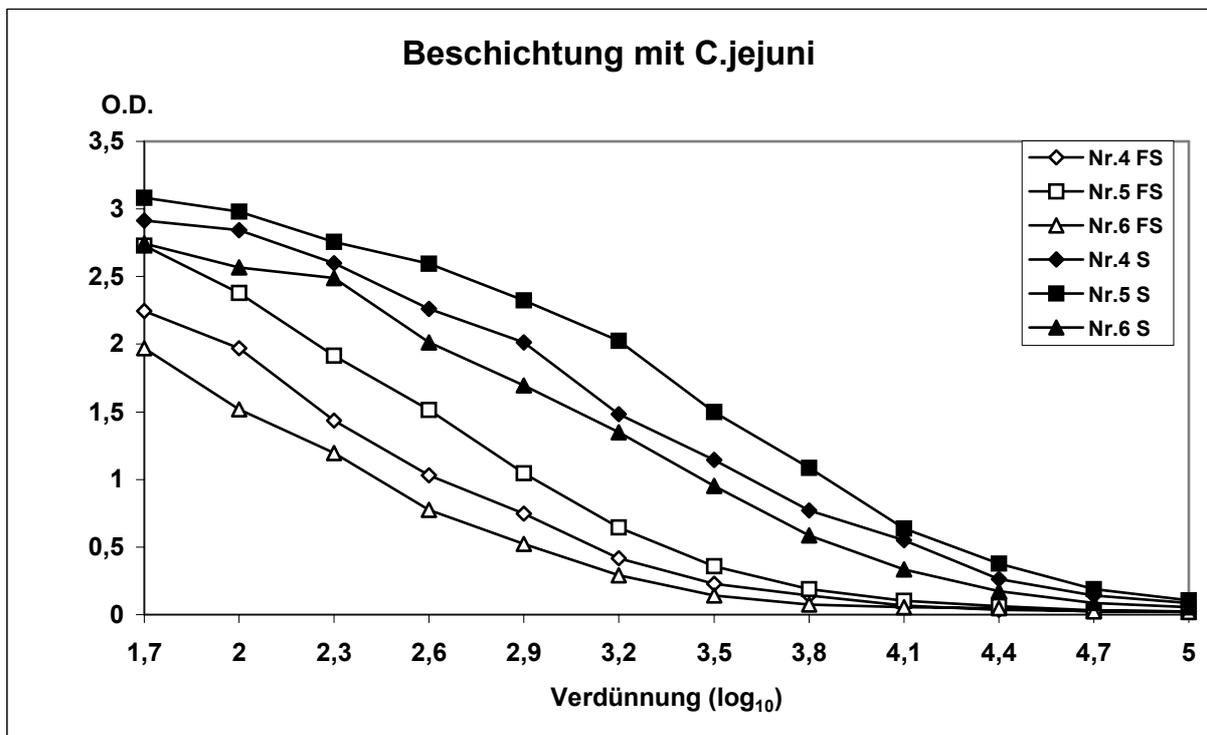
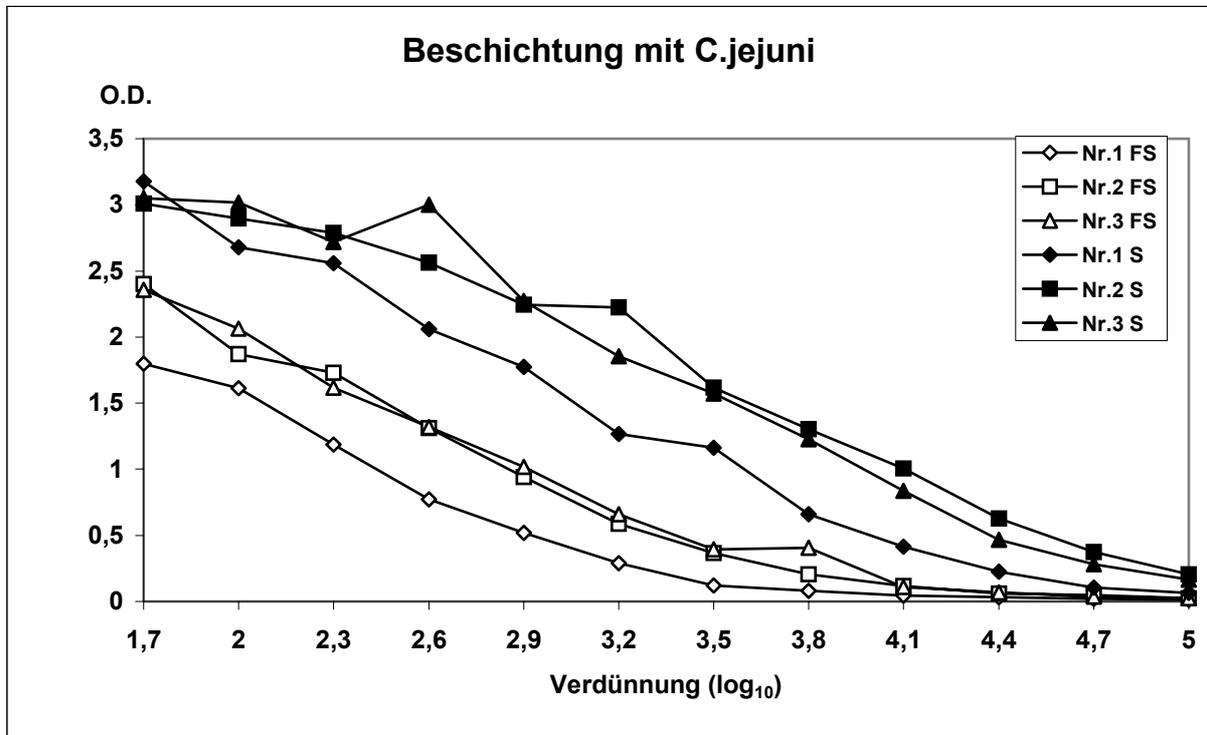


Abbildung 12 Titration des Fleischsaftes (FS) und der Schlachtseren (S) der Impfschweine 1-6 auf einer Platte mit C.c.-Beschichtung

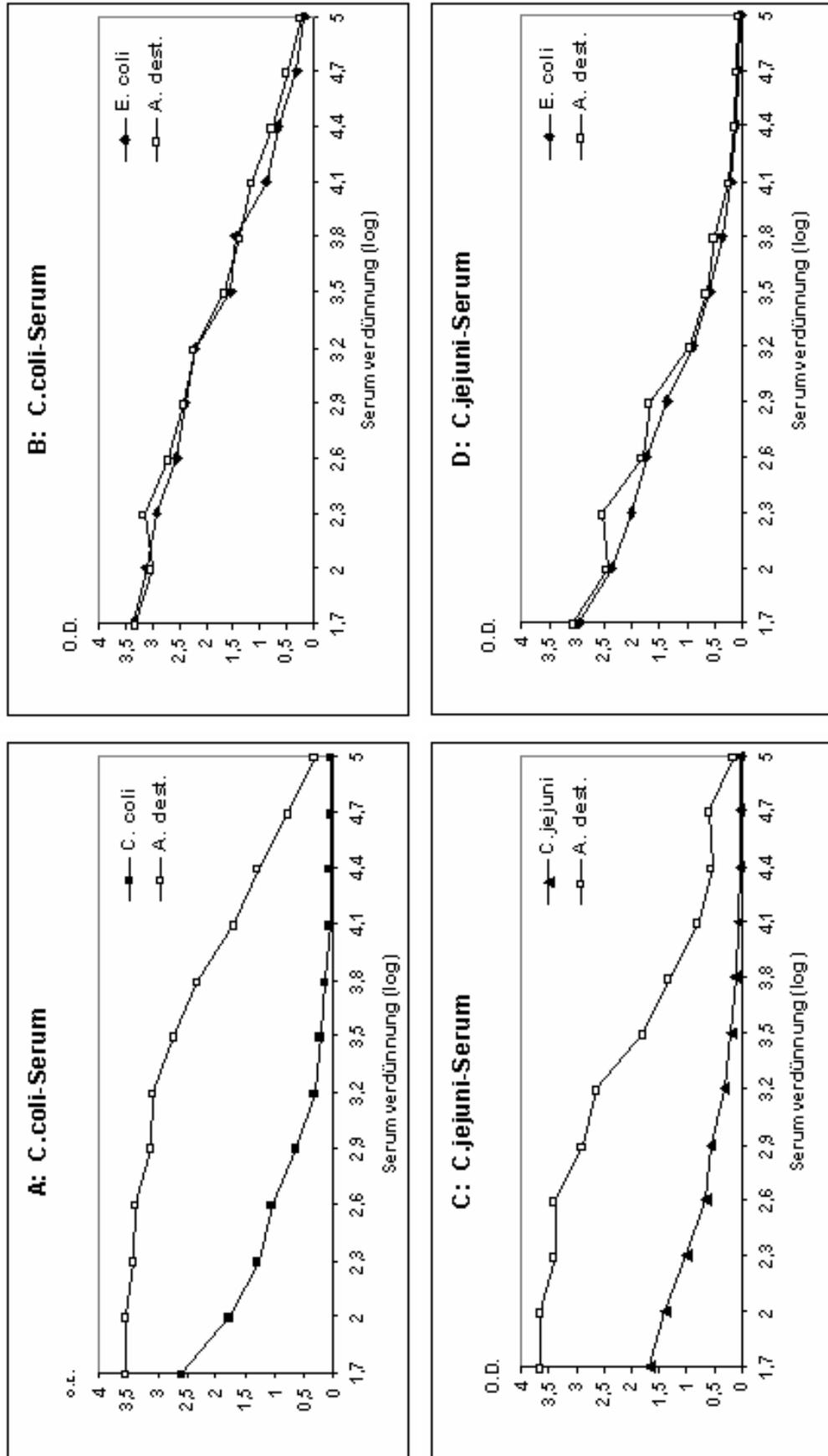


**Abbildung 13 Titration des Fleischsaftes (FS) und der Schlachtseren (S) der Impfschweine 1-6 auf einer Platte mit C.jej.-Beschichtung**

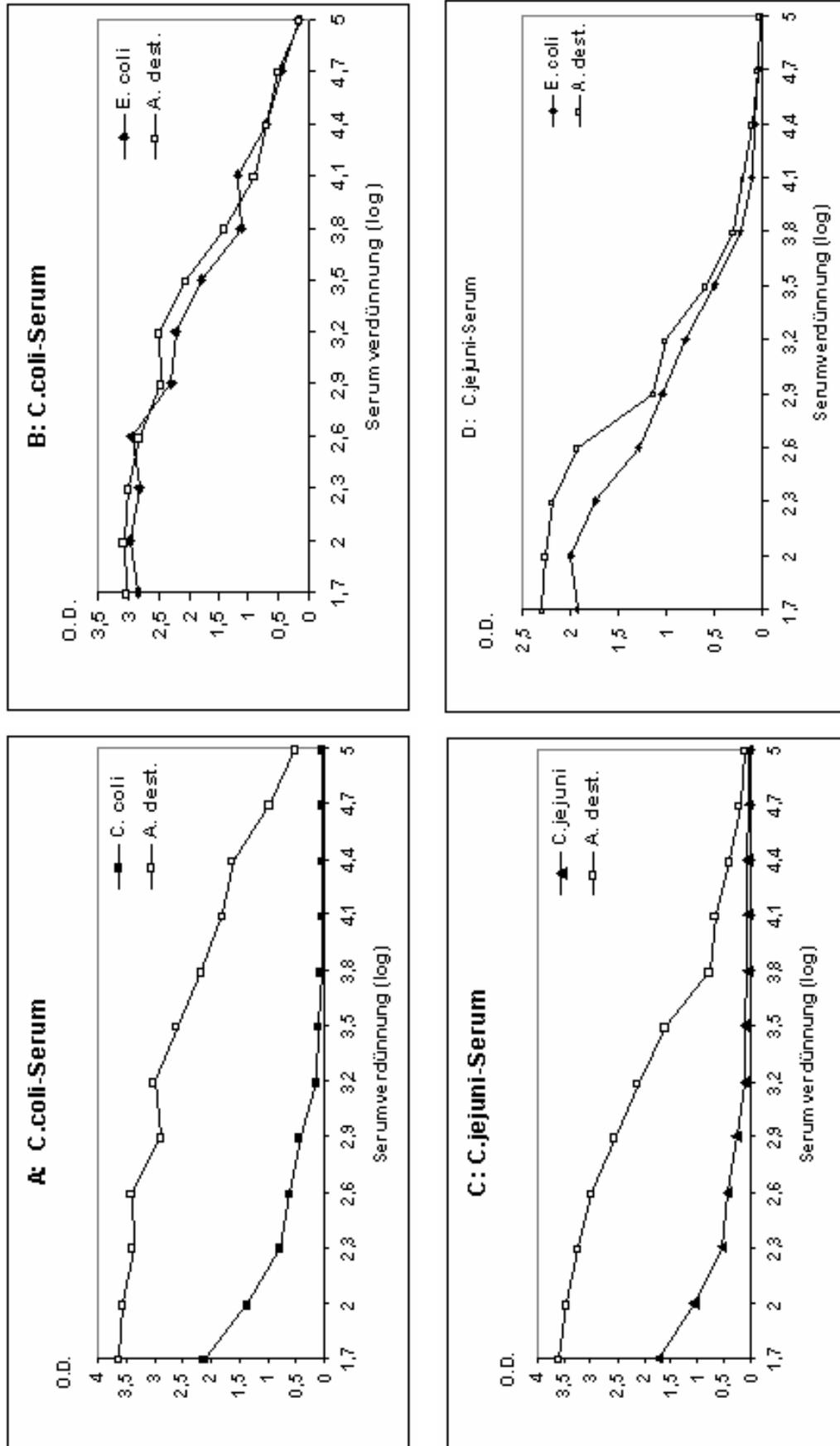


#### **IV.6 Präadsorption der Impfschweine-Schlachtseren mit dem homologen Antigen und mit Escherichia coli**

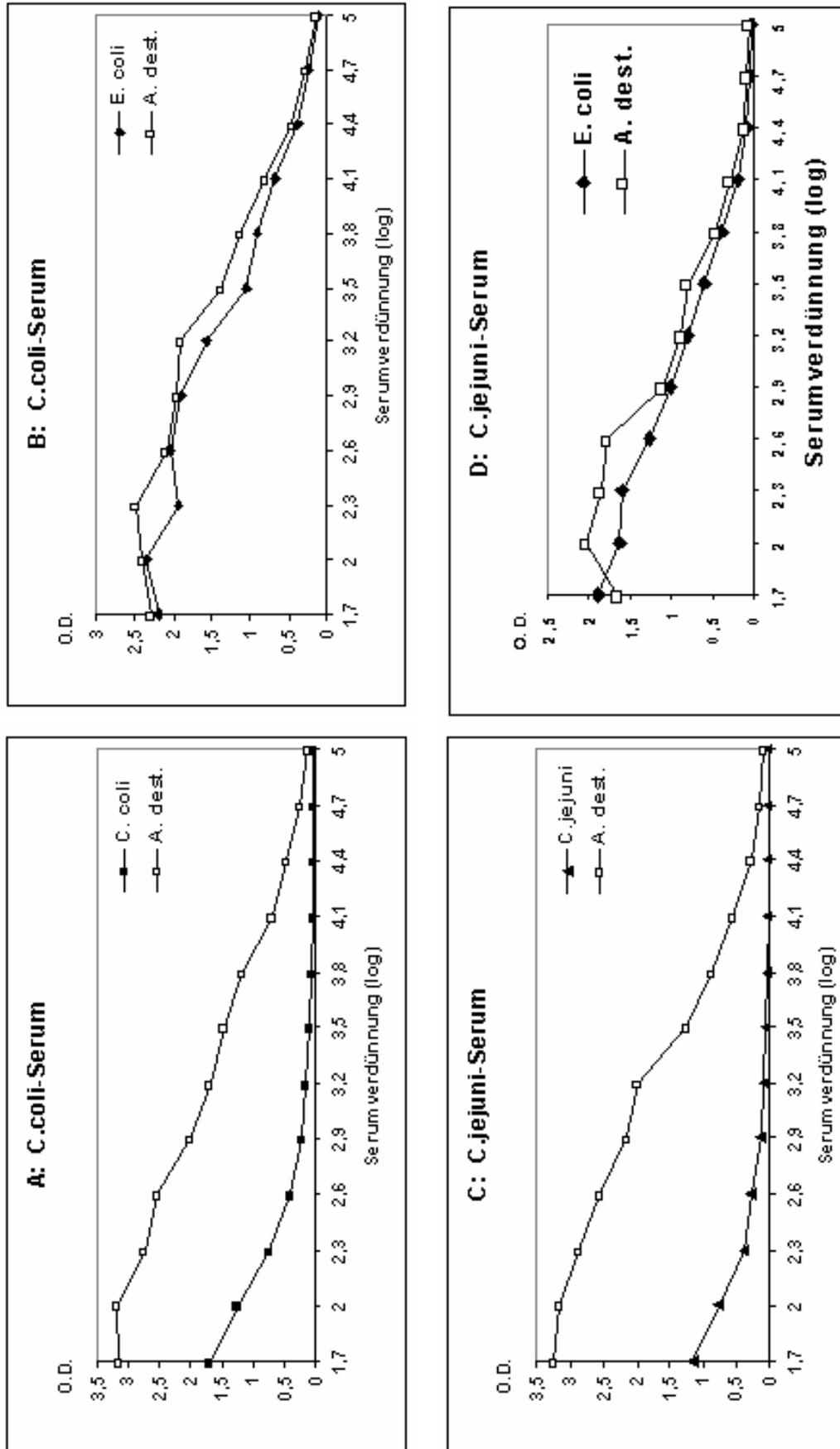
Die Präadsorption der Seren mit dem homologen Antigen zeigte auf mit C.c., C.jej. und C.-Mix (C.c./C.jej.) beschichteten Mikrotiterplatten im Vergleich zu der Kontrollinkubation der Seren mit A. dest. eine drastische Abnahme der OD-Werte (**Tabelle 54 bis 59**). In den **Abbildungen 14 bis 16** werden die Ergebnisse der Präadsorption der Seren mit dem homologen Antigen bzw. mit E.coli-Antigen dargestellt. Die OD-Werte der Seren bei einer „Präadsorption“ mit A. dest. lagen je nach Antigenbeschichtung der Mikrotiterplatten und eingesetztem Serum bei einer 1:400 ( $\log_{10} 2,6$ ) Serumverdünnung in einem OD-Bereich von etwa 2,5 bis 3,5. Durch die Präadsorption derselben Seren mit den homologen Antigenen wurden deutlich niedrigere OD-Werte gemessen, die bei einer 1:400 Serumverdünnung in einem OD-Bereich zwischen 0,5 und 1,0 schwankten. Der Einsatz einer E.coli Antigensuspension anstelle der homologen C.-Stämme zur Präadsorption der Seren, zeigte im Vergleich zur Inkubation mit A. dest. nur geringe Abweichungen der OD-Werte (**Tabellen 60 bis 65**). Auf der C.-Mix beschichteten Platte war ein nahezu paralleler Verlauf der OD-Werte zu verzeichnen.



**Abbildung 14: Nachweis der unterschiedlichen Bindung an C. Mix beschichtete Platten nach Präadsorption verschiedener Serumverdünnungen mit homologem Ag (A und C) bzw E. Coli ( B und D) jeweils im Vergleich zur Präinkubation mit A. dest**



**Abbildung 15: Nachweis der unterschiedlichen Bindung an C. Coli beschichtete Platten nach Präadsorption verschiedener Serumverdünnungen mit homologem Ag (A und C) bzw E. Coli ( B und D) jeweils im Vergleich zur Präinkubation mit A. dest**



**Abbildung 16: Nachweis der unterschiedlichen Bindung an C. jej. beschichtete Platten nach Präadsorption verschiedener Serumverdünnungen mit homologem Ag (A und C) bzw E. Coli ( B und D) jeweils im Vergleich zur Präinkubation mit A. dest**

## **IV.7 Serologische Untersuchungsergebnisse der Feldserumproben**

Die bei der Untersuchung von Feldserumproben gemessenen OD-Werte ließen sich in unterschiedliche OD-Bereiche einteilen.

Als unterer OD-Bereich wurden bei Serumproben (1:400 verdünnt) OD-Werte bis 0,4 und als mittlerer Bereich Werte zwischen 0,4 und etwa 0,7 angesehen. Von einem höheren OD-Bereich wurde ab OD-Werten über 0,7 gesprochen. Diese Einteilung wurde getroffen, wenn der lineare Bereich der Kontrolltitration der Hyperimmunseren bei einer Verdünnung ab  $\log_{10} 2,3$  zu erkennen war. Lag der lineare Bereich der Kontrolltitrationen ab  $\log_{10} 2$ , wurden OD-Werte bis 0,25 als niedrig, zwischen 0,25 und 0,5 als mittel und ab einem OD-Wert von 0,5 als hoch angesprochen.

Serumproben zeigten auf Mix beschichteten Platten vergleichend zu C.c. oder C.jej. beschichteten meist höhere OD-Werte. Viele Seren wiesen im Vergleich zwischen C.c. beschichteten und C.jej. beschichteten Platten häufiger höhere OD-Werte auf den C.c. beschichteten Mikrotiterplatten, wobei einzelne Seren aber auch auf C.jej. Beschichtungen höhere OD-Werte aufwiesen.

### **IV.7.1 Vergleichender Einsatz von zwei Serumverdünnungen auf verschiedenen Beschichtungsplatten**

Die OD-Bereiche und Mittelwerte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren auf Platten mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen aus 7 verschiedenen Einsendungen (SE) wurden in **Tabelle 15** dargestellt. Serumverdünnungen von 1:100 und 1:400 ließen gleichermaßen eine Einteilung der OD-Werte in untere, mittlere und höhere OD-Bereiche zu.

In **Tabelle 16** wurden Serumverdünnungen von 1:100 und 1:400 vergleichend auf C.c., C.jej und einer C.Mix Beschichtung dargestellt. Die Ergebnisse der 1:100 verdünnten Proben zeigten OD-Werte die zwischen 0,591 und 1,674 lagen. Vergleichend hierzu die OD-Werte der 1:400 Verdünnung, die zwischen 0,234 und 0,779 gemessen wurden. Unter Berücksichtigung der nicht einzeln dargestellten Kontrolltitrationen konnte diese Einsendung insgesamt betrachtet als eine Einsendung mit unteren bis mittleren OD-Werten bewertet werden. Als eine Einsendung mit nahezu ausschließlich dem oberen OD-Bereich zugehörigen Werten

konnte die Einsendung SE 4 eingestuft werden. Die einzelnen OD-Werte hierzu sind in **Tabelle 17** vergleichend in einer 1:100 und einer 1:400 Verdünnung auf C.c., C. jej. und Mix beschichteten Platten dargestellt.

**Tabelle 15 OD-Bereiche und Mittelwerte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren aus 7 Einsendungen (SE) auf Platten mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix)**

Einsendung (Anzahl der Proben)	Beschichtung	Serumverdünnung 1:100		Serumverdünnung 1:400	
		OD-Bereich	OD-Mittelwert	OD-Bereich	OD-Mittelwert
SE 8 (n=29)	C.c.	0,699-1,520	1,006	0,406-1,139	0,734
	C.jej.	0,398-1,070	0,727	0,298-1,044	0,570
	Mix	0,590-1,722	1,110	0,349-1,332	0,862
SE 9 (n=20)	C.c.	0,721-1,375	1,057	0,358-1,048	0,620
	C.jej.	0,517-1,090	0,839	0,290-0,835	0,510
	Mix	0,806-1,813	1,244	0,483-0,858	0,642
SE 10 (n=24)	C.c.	0,424-1,342	0,841	0,226-1,006	0,548
	C.jej.	0,343-1,231	0,672	0,110-0,886	0,366
	Mix	0,467-1,462	0,996	0,248-1,063	0,591
SE 11 (n=15)	C.c.	0,669-1,240	0,928	0,280-0,750	0,501
	C.jej.	0,432-1,082	0,759	0,231-0,532	0,362
	Mix	0,826-1,606	1,168	0,385-0,969	0,660
SE 12 (n=15)	C.c.	0,690-1,291	1,030	0,374-1,264	0,608
	C.jej.	0,653-1,105	0,815	0,282-0,739	0,454
	Mix	1,074-1,465	1,225	0,438-0,904	0,618
SE 3 (n=15)	C.c.	0,677-1,138	0,926	0,273-0,779	0,479
	C.jej.	0,591-0,956	0,769	0,234-0,646	0,384
	Mix	1,033-1,674	1,191	0,409-0,772	0,589
SE 4 (n=15)	C.c.	0,905-1,680	1,436	0,422-1,817	1,001
	C.jej.	0,802-1,749	1,187	0,543-1,218	0,899
	Mix	1,295-2,453	1,838	0,419-1,474	0,977

**Tabelle 16 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren einer Einsendung (SE 3) auf je einer mit C.c., C.jej.- oder C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1 :100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1: 400		
	<b>Antigenbeschichtung mit</b>			<b>Antigenbeschichtung mit</b>		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,872	0,701	1,046	0,553	0,348	0,513
2	0,975	0,788	1,244	0,434	0,440	0,650
3	1,051	0,725	1,082	0,366	0,286	0,518
4	0,870	0,736	1,097	0,330	0,353	0,487
5	0,774	0,836	1,100	0,570	0,453	0,582
6	0,793	0,607	1,033	0,509	0,356	0,506
7	1,046	0,822	1,228	0,545	0,416	0,692
8	1,001	0,895	1,273	0,779	0,442	0,720
9	1,138	0,956	1,674	0,608	0,646	0,772
10	0,677	0,749	1,183	0,314	0,352	0,482
11	0,806	0,731	1,045	0,273	0,234	0,409
12	1,018	0,747	1,086	0,500	0,394	0,618
13	0,930	0,591	1,224	0,473	0,351	0,605
14	1,001	0,819	1,341	0,485	0,341	0,641
15	0,943	0,832	1,209	0,443	0,355	0,637

**Tabelle 17 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren einer Einsendung (SE 4) auf je einer mit C.c., C.jej.- oder C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1 :100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1: 400		
	<b>Antigenbeschichtung mit</b>			<b>Antigenbeschichtung mit</b>		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	1,038	1,215	1,648	1,570	0,833	0,884
2	1,680	1,460	1,841	1,893	1,002	1,111
3	1,646	1,217	1,985	1,073	1,074	1,189
4	1,627	1,209	1,996	0,826	1,017	1,139
5	0,905	0,802	1,295	0,422	0,543	0,581
6	1,292	0,970	1,787	0,702	0,669	1,000
7	1,740	1,183	1,926	0,937	0,979	0,419
8	1,508	1,111	1,588	1,817	0,795	0,941
9	1,500	1,306	1,916	0,784	0,964	1,124
10	1,378	1,304	1,881	0,865	0,728	1,055
11	1,793	1,749	2,453	1,005	1,197	1,474
12	1,294	1,169	1,937	0,823	1,218	0,913
13	1,235	0,888	1,498	0,599	0,600	0,922
14	1,344	0,917	1,710	0,797	0,815	0,803
15	1,559	1,311	2,102	0,905	1,046	1,105

#### IV.7.2 Bestimmung der Campylobacter-OD-Werte in Seren von Muttersauen und Ferkeln

Insgesamt 12 Serumproben einer Einsendung (SE 5) von Muttersauen, die kurze Zeit vor bzw. nach der Geburt entnommen worden waren, zeigten bei einer 1:400 Verdünnung auf einer Mix-Beschichtung (C.c./C.jej.) OD-Werte zwischen 0,191 und 0,573. Die Darstellung der einzelnen Ergebnisse ist der **Tabelle 18** zu entnehmen. Serumproben von Ferkeln (bis 25 kg Körpergewicht) aus unterschiedlichen Beständen, zeigten wie in **Tabelle 19** dargestellt, sehr niedrige OD-Werte von 0,075 bis 0,267.

**Tabelle 18** Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben von Muttersauen aus Einsendung (SE 5) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte

<b>Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
OD- Werte bei		
Serumverdünnung		
Proben Nr.	1:100	1:400
1	0,689	0,479
2	0,771	0,446
3	0,682	0,250
4	0,736	0,400
5	0,737	0,267
6	0,731	0,388
7	0,429	0,191
8	0,795	0,375
9	0,772	0,434
10	1,001	0,573
11	0,768	0,285
12	0,703	0,320

**Tabelle 19 Vergleichende Darstellung der OD-Werte von 1:400 verdünnten Serumproben von Ferkeln auf je einer mit C.c. und C.jej. beschichteten Platte**

	OD-Werte bei Serumverdünnung 1:400	
	<b>Antigenbeschichtung mit</b>	
Proben Nr.	C.c.	C.jej.
1	0,102	0,267
2	0,122	0,054
3	0,216	0,169
4	0,233	0,169
5	0,263	0,173
6	0,075	0,109

#### **IV.7.3 Vergleichende Darstellung von Campylobacter OD-Werten und Salmonellen- Antikörper Ergebnissen**

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse auf Salmonellen-Antikörper (Salmonellen-Antikörper Bestimmung durch Salmotype®-ELISA) mit den gemessenen C.-Antikörper-OD-Werten konnte keine Beziehung festgestellt werden. So wurden beispielsweise in einer Einsendung von 23 Serumproben (**Tabelle 20**) sechs Proben als Salmonellen-Ak positiv bewertet. Diese Proben zeigten aber im Vergleich zu den Salmonellen-Ak negativen Proben keine auffälligen C.-Ak Werte. Auch wiesen insgesamt Einsendungen mit Salmonellen-Ak positiven Proben (**Tabellen 20 und 21**) keine auffällig hohen C.-Ak OD-Bereiche auf.

**Tabelle 20** Darstellung der OD-Werte von 1:400 verdünnten Feldseren (SE 6) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

Antigenbeschichtung Mix (C.c./C.jej)		Salmotype®- ELISA
Proben Nr.	OD-Wert	Ergebnis
1	0,291	pos
2	0,363	neg
3	0,570	pos
4	0,667	pos
5	0,457	neg
6	0,386	neg
7	0,768	neg
8	0,490	neg
9	0,512	neg
10	0,403	neg
11	0,507	neg
12	0,335	neg
13	0,607	neg
14	0,594	pos
15	0,700	neg
16	0,414	pos
17	0,439	pos
18	0,091	neg
19	0,075	neg
20	0,053	neg
21	0,040	neg
22	0,046	neg
23	0,071	neg

**Tabelle 21** Darstellung der OD-Werte von 1:400 verdünnten Feldseren (SE 7) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

Antigenbeschichtung Mix (C.c./C.jej)		Salmotype®- ELISA
Proben Nr.	OD-Wert	Ergebnis
1	0,409	neg
2	0,235	pos
3	0,437	pos
4	0,401	neg
5	0,286	neg
6	0,478	neg
7	0,344	neg
8	0,426	neg
9	0,499	neg
10	0,379	neg
11	0,283	neg
12	0,278	pos
13	0,454	pos
14	0,377	neg
15	0,623	neg
16	0,835	neg
17	0,625	neg
18	0,872	neg
19	0,677	neg
20	0,334	neg
21	0,610	neg
22	0,770	neg
23	0,686	neg

#### IV.8 Serologische Untersuchung von Fleischsaftproben

Auch die Untersuchung der Fleischsaftproben auf C.-Antikörper ließ wie die Untersuchung der Feldserumproben eine Abstufung der OD-Werte erkennen (**Tabellen 81 bis 90**). Als unterer OD-Bereich wurden bei einer 1:100 Verdünnung OD-Werte bis 0,3 und als mittlerer Bereich zwischen 0,3 und etwa 0,5 eingestuft. OD-Werte >0,5 galten als höherer OD-Bereich. Diese Einteilung wurde getroffen, wenn der lineare Bereich der Kontrolltitration bei einer Serumverdünnung ab  $\log_{10} 2,6$  zu erkennen war. Lag der lineare Bereich der Kontrolltitrationen ab  $\log_{10} 2$  wurden OD-Werte bis 0,25 als niedrig, zwischen 0,25 und 0,4 als mittel und ab einem OD-Wert von 0,4 als vergleichsweise hoch eingestuft.

OD-Werte der C.c.- und der C.jej.-Beschichtung lagen im allgemeinen in vergleichbaren OD-Bereichen.

Die Mittelwerte und vom Mittelwert abweichenden OD-Werte der 1:30 und 1:100 verdünnten und auf mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen beschichteten Platten gemessenen Feldfleischsaftproben aus 4 verschiedenen Einsendungen (FS 3, FS 16 bis FS 18) wurden in **Tabelle 22** dargestellt. Fleischsaftverdünnungen von 1:30 und 1:100 ließen gleichermaßen eine Einteilung der OD-Werte in untere, mittlere und höhere OD-Bereiche zu.

In **Tabelle 23** sind Ergebnisse einer Einsendung FS 1 mit 15 Proben dargestellt, welche bei einer Probenverdünnung von 1:100 im unteren bis mittleren OD-Bereich eingestuft wurden. Auf den mit C.c., C.jej. und C.c./C.jej. (Mix) beschichteten Platten liegen die gemessenen OD-Werte zwischen 0,080 und 0,529. Vergleichend zu dieser Einsendung sind in **Tabelle 24** Ergebnisse einer anderen Einsendung (FS 2) dargestellt, die mit Werten von 0,187 bis 0,926 im höheren OD-Bereiche liegen.

**Tabelle 22 OD-Bereiche und Mittelwerte von 1:30 und 1:100 verdünnten Fleischsaftproben aus 4 Einsendungen (FS 3 und FS 16-18) auf Platten mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix)**

Einsendung (Probenanzahl)	Beschichtung	FS-Verdünnung 1:30		FS-Verdünnung 1:100	
		OD-Bereich	OD-Mittelwert	OD-Bereich	OD-Mittelwert
FS 3 (n=9)	C.c.	0,551-1,049	0,800	0,272-0,699	0,443
	C.jej.	0,433-0,761	0,575	0,179-0,413	0,285
	Mix	0,485-1,011	0,770	0,258-0,515	0,372
FS 16 (n=10)	C.c.	0,422-1,063	0,800	0,166-0,621	0,388
	C.jej.	0,329-0,808	0,600	0,134-0,413	0,252
	Mix	0,409-0,939	0,725	0,149-0,722	0,376
FS 17 (n=10)	C.c.	0,656-1,033	0,888	0,409-0,777	0,510
	C.jej.	0,467-0,799	0,612	0,226-0,412	0,308
	Mix	0,753-1,109	0,882	0,374-0,608	0,451
FS 18 (n=9)	C.c.	0,684-1,441	1,061	0,296-1,170	0,673
	C.jej.	0,469-1,037	0,681	0,170-0,605	0,357
	Mix	0,875-1,375	1,047	0,229-0,856	0,572

**Tabelle 23 Vergleichende Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Fleischsaftproben (FS 1) auf je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben-Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung		
	1:100		
	Antigenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,388	0,214	0,322
2	0,109	0,081	0,095
3	0,261	0,176	0,346
4	0,080	0,067	0,098
5	0,330	0,198	0,258
6	0,194	0,159	0,176
7	0,138	0,120	0,151
8	0,427	0,330	0,472
9	0,213	0,198	0,228
10	0,120	0,087	0,135
11	0,127	0,171	0,222
12	0,202	0,262	0,352
13	0,529	0,317	0,457
14	0,485	0,253	0,357
15	0,296	0,207	0,210

**Tabelle 24 Vergleichende Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Fleischsaftproben (FS 2) auf je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben-Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung		
	1:100		
	Antigenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,604	0,636	0,866
2	0,579	0,490	0,574
3	0,301	0,392	0,497
4	0,348	0,256	0,427
5	0,314	0,308	0,359
6	0,395	0,234	0,368
7	0,398	0,233	0,327
8	0,586	0,313	0,458
9	0,286	0,187	0,239
10	0,508	0,382	0,530
11	0,208	0,268	0,408
12	0,743	0,638	0,926
13	0,371	0,248	0,333
14	0,394	0,284	0,426
15	0,338	0,319	0,573

#### **IV.8.1 Vergleichender Einsatz von zwei Fleischsaftverdünnungen auf verschiedenen Beschichtungsplatten**

Ergebnisse des vergleichenden Einsatzes von 1:30 und 1:100 verdünnten Fleischsaftproben auf C.c., C. jej. und C.c./C.jej. (Mix) beschichteten Platten sind in **Tabelle 25** sowie in den **Tabellen 81 bis 83** (im Anhang) dargestellt. Die OD-Werte der einzelnen Probennummern weisen auf der C.jej. beschichteten Platte in beiden Probenverdünnungen meist die niedrigsten OD-Werte auf. Ergebnisse der C.c. und C.c./C.jej. (Mix) beschichteten Platten liegen im allgemeinen in vergleichbaren OD-

Bereichen. Liegen die OD-Werte auf der C.-Mix Platte in einer 1:30 Verdünnung in Bereichen z.B. zwischen 0,485 und 1,011, so bewegen sich die 1:100 Verdünnungen zwischen 0,258 und 0,515.

**Tabelle 25 Vergleich der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben einer Einsendung (FS 3) auf je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:30			OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	<b>Antigenbeschichtung mit</b>			<b>Antigenbeschichtung mit</b>		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,931	0,761	1,011	0,699	0,375	0,453
2	0,718	0,624	0,675	0,377	0,274	0,287
3	0,735	0,558	0,705	0,415	0,179	0,308
4	0,605	0,491	0,696	0,272	0,234	0,260
5	1,049	0,537	0,778	0,562	0,288	0,486
6	0,978	0,659	0,966	0,523	0,413	0,515
7	0,835	0,576	0,925	0,470	0,337	0,498
9	0,551	0,433	0,485	0,292	0,195	0,258
10	0,798	0,537	0,690	0,379	0,270	0,280

#### IV.8.2 Vergleichende Darstellung von Campylobacter-OD-Werten und Salmonellen- Antikörper Ergebnissen in Fleischsaft

Zwischen Salmonellen-Ak positiven Proben und C.-Ak Ergebnissen konnte keine Beziehung festgestellt werden. Positive Salmonellen-Ak Proben lagen wie in **Tabelle 26** (FS 4) dargestellt, bei der C.-Ak Bestimmung z. B bei OD-Werten von 0,127 und 0,353, wohingegen negative Salmonellen-Ak Proben OD-Werte von 0,430 aufwiesen. Ein weiteres Beispiel stellt die Anfangs-Einsendung (FS 9) des Bestandes B dar (**Tabelle 28**), bei der 13 Proben positiv und zwei negativ auf Salmonellen-Ak ausfielen. Bei der C.-Ak Bestimmung lagen die OD-Werte im unteren bis mittleren Bereich zwischen 0,174 und 0,487.

**Tabelle 26** Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben (FS 4) auf einer mit Mischantigen beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

OD Werte bei einer Mischbeschichtung Fleischsaftverdünnung		
Proben Nr.	1:100	Salmonellen-Ak
1	0,127	pos
2	0,262	neg
3	0,353	pos
4	0,110	neg
5	0,147	neg
6	0,228	neg
7	0,261	neg
8	0,260	neg
9	0,176	neg
10	0,430	neg
11	0,395	neg

#### **IV.8.3 Ergebnisse der Untersuchung auf Campylobacter-Antikörper von mehreren Fleischsaft-Einsendungen einzelner Schweinebestände**

In den **Tabellen 27 bis 29** sind die C. OD-Werte der vier Einsendungen der Bestände A und B, sowie die drei Einsendungen des Bestandes C zusammen mit den Ergebnissen der Salmonellen-Antikörperbestimmung dargestellt.

Bei den vier zeitlich voneinander getrennten Einsendungen ( FS 5 bis FS 8), die von **Bestand A** zur Verfügung standen, lagen die OD-Werte der 1:100 verdünnten Proben auf den mit C.-Mix beschichteten Platten, wie in **Tabelle 27** dargestellt, in einem OD-Bereich zwischen 0,068 und 0,673. Die OD-Werte der vierten Einsendung (FS 8) lagen im Vergleich zu den Werten der ersten drei Einsendungen „etwas“ höher. Bei den ersten beiden Einsendungen lagen die OD-Werte in einem Bereich zwischen 0,068 und 0,417. In der 3. Einsendung (FS 7) wurde ein einzelner OD-Wert von 0,502 gemessen, die restlichen Werte waren jedoch mit den Werten der ersten beiden Einsendungen vergleichbar. Bei der vierten Einsendung lagen die OD-Werte schließlich in einem Bereich zwischen 0,203 und 0,673, mit vier von acht Werten über 0,400.

Die Proben der vier Einsendungen des **Bestandes B** bewegten sich im allgemeinen wie **Tabelle 28** zeigt in einem OD-Bereich zwischen 0,053 und 0,487. Die erste Einsendung (FS 9) zeigte OD-Werte zwischen 0,063 und 0,487, wobei 13 der 15 Proben im Salmonellen-Ak-Test positiv waren. Drei Proben der zweiten Einsendung (FS 10) lagen bei OD-Werten von 0,524, 0,594 und 0,647. In dieser Einsendung wurde eine der 14 Proben als Salmonellen positiv bewertet.

Einige OD-Werte des **Bestandes C (Tabelle 29)** lagen im Vergleich zu den beiden anderen Beständen in einem höheren OD-Bereich zwischen 0,187 und 1,115, wobei 20 von insgesamt 48 Proben des Bestandes C OD-Werte zwischen 0,400 und 1,115 zeigten.

**Tabelle 27** Darstellung der OD-Werte der 4 Einsendungen FS 5 bis 8 von 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben des Bestandes A auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)		
OD- Werte bei Fleischsaftverdünnung		Salmotype®- ELISA
Einsendung 1 (FS 5)	1:100	Ergebnis
1	0,163	neg
2	0,129	neg
3	0,310	neg
4	0,417	neg
Einsendung 2 (FS 6)		
1	0,270	neg
2	0,303	neg
3	0,091	neg
4	0,068	neg
5	0,259	neg
6	0,092	neg
Einsendung 3 (FS 7)		
1	0,233	neg
2	0,357	neg
3	0,150	neg
4	0,260	neg
5	0,502	neg
6	0,147	neg
7	0,215	neg
Einsendung 4 (FS 8)		
1	0,326	neg
2	0,504	neg
3	0,548	neg
4	0,433	neg
5	0,673	neg
6	0,203	neg
7	0,351	neg
8	0,223	neg

**Tabelle 28** Darstellung der OD-Werte der 4 Einsendungen FS 9 bis 12 von 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben des Bestandes B auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)		
OD- Werte bei Fleischsaftverdünnung		Salmotype®- ELISA
Einsendung 1 (FS 9)	1:100	Ergebnis
1	0,346	pos
2	0,329	pos
3	0,220	neg
4	0,143	pos
5	0,258	pos
6	0,235	pos
7	0,174	pos
8	0,140	pos
9	0,204	pos
10	0,248	pos
11	0,063	neg
12	0,261	pos
13	0,487	pos
14	0,233	pos
15	0,226	pos
Einsendung 2 (FS 10)		
1	0,155	neg
2	0,231	neg
3	0,172	pos
4	0,594	neg
5	0,105	neg
6	0,187	neg
7	0,471	neg
8	0,258	neg
9	0,647	neg
10	0,524	neg
11	0,155	neg
12	0,247	neg
13	0,197	neg
14	0,053	neg

## Fortsetzung Tabelle 28

Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)		
OD- Werte bei Fleischsaftverdünnung		Salmotype®- ELISA
Einsendung 3 (FS 11)		
1	0,209	neg
2	0,375	neg
3	0,274	neg
4	0,349	pos
5	0,238	neg
6	0,333	neg
7	0,224	neg
8	0,451	neg
9	0,253	neg
10	0,259	neg
11	0,130	neg
12	0,280	neg
13	0,447	neg
14	0,465	neg
15	0,233	neg
Einsendung 4 (FS 12)		
1	0,319	neg
2	0,295	neg
3	0,318	neg
4	0,176	neg
5	0,130	neg
6	0,380	neg
7	0,273	neg
8	0,284	neg
9	0,353	neg
10	0,270	neg
11	0,327	neg
12	0,294	neg
13	0,246	neg

**Tabelle 29** Darstellung der OD-Werte der 4 Einsendungen FS 13 bis 15 von 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben des Bestandes C auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)		
OD- Werte bei Fleischsaftverdünnung		Salmotype®- ELISA
Einsendung 1 (FS 13)	1:100	Ergebnis
1	0,187	neg
2	0,416	neg
3	0,500	neg
4	0,443	neg
5	0,200	neg
6	0,408	neg
7	0,329	neg
8	0,214	neg
9	0,325	neg
10	0,725	neg
11	0,324	neg
12	0,355	neg
13	0,416	neg
14	0,348	neg
15	0,523	neg
16	0,508	neg
17	0,328	neg

## Fortsetzung Tabelle 29

Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)		
OD- Werte bei Fleischsaftverdünnung		Salmotype®- ELISA
Einsendung 2 (FS 14)	1:100	Ergebnis
1	0,358	pos
2	0,513	neg
3	0,261	neg
4	0,583	neg
5	1,115	neg
6	0,414	neg
7	0,205	neg
8	0,777	neg
9	0,351	neg
10	0,268	neg
11	0,552	neg
12	0,439	neg
13	0,231	neg
14	0,270	neg
15	0,279	neg
16	0,321	neg
17	0,342	pos
Einsendung 3 (FS 15)		
1	0,786	neg
2	0,474	neg
3	0,545	neg
4	0,259	neg
5	0,187	neg
6	0,316	neg
7	0,263	neg
8	0,433	neg
9	0,241	neg
10	0,245	neg
11	0,298	neg
12	0,294	neg
13	0,456	neg
14	0,273	neg

## **V. DISKUSSION**

Lebensmittelbedingte C.-Infektionen des Menschen spielen bei gastrointestinalen Erkrankungen des Menschen eine zunehmende Rolle (BgVV, 1998). In Deutschland rangieren durch C. verursachte Darmerkrankungen nach den Salmonellen-Infektionen an zweiter Stelle (RKI, 1999). Auch Schweine werden als latente Träger und Ausscheider von C. angesehen (WEBER, 1985; KRAUSS et al., 1997). Um das Vorkommen von mit C.-Epitopen reagierenden Antikörpern in Schweineseren und Fleischsaft untersuchen zu können, wurde ein indirekter ELISA entwickelt. Mehrfache parenterale Immunisierungen von Schweinen dienten der Gewinnung von hochtitrigen Seren.

### **V.1 Methodik**

Zum Nachweis von C.-spezifischen Antikörpern beim Schwein wurde ein indirekter ELISA entwickelt; Sandwich- oder Kompetitionsverfahren waren nicht möglich, da ein - zur Etablierung solcher Testsysteme notwendiges – definiertes Positivserum nicht zur Verfügung stand.

Schweine scheiden neben C.jej. (GÖRGEN, 1982; STICHT-GROH, 1982; WEBER et al., 1985) vor allem C.c. aus (WUTHE und VOLKHEIMER, 1986; GAULL et al., 2001); da diese beiden C. spp. auch verantwortlich für die Campylobacteriose des Menschen sind, wurden sie als Antigen für den ELISA verwendet. Für die Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Antigen wurden aus der Stammsammlung des STUA Aulendorf zunächst je zwei C.c.- und C.jej.-Stämme getestet, die sich grundsätzlich alle eigneten. Für die Antigenherstellung wurden auf Grund der leichteren Kultivierbarkeit bzw. der einfacheren Handhabung der C.jej. CCUG-Stamm 10935 und der C.c. Feldstamm B243 verwendet. Da bei Schweinen auch Mischinfektionen mit C.c. und C.jej. beschrieben sind (MADDEN et al., 2000), wurden auch mit einem Mix (C.c. und C.jej.) beschichtete Platten verwendet. Dabei ergaben sich im Vergleich zu den Einzelbeschichtungen mit C.c. und C.jej. teilweise sogar etwas höhere OD-Werte als der rechnerische Mittelwert der Einzelbeschichtungen. Somit war sichergestellt, dass gegen C.c. und gegen C.jej. gerichtete Antikörper auch bei einer Mix-Beschichtung erfasst wurden.

Bei allen Ansätzen wurde mit der gleichen Proteinkonzentration beschichtet, dennoch ergaben sich deutliche Unterschiede in den gemessenen OD-Werten:

eine Beschichtung der Platten mit **intakten Bakterien** ergab sehr niedrige Messwerte; die Keime binden möglicherweise nicht stabil und/oder präsentieren auf Grund ihrer Größe (sterische Behinderung) vergleichsweise wenig relevante Epitope. Durch Ultraschall **fragmentierte Bakterien** konnten gut an die Platten gebunden werden, wobei sich aber ein vorgeschalteter **Waschschritt** als ungeeignet erwies. Durch diesen Waschvorgang gingen wichtige antigene Strukturen verloren, wodurch alle gemessenen Proben vergleichsweise niedrige OD-Werte zeigten. Auch die **Präparation von Flagellin** nach LOGAN und TRUST (1983) führte zu einer deutlichen Erhöhung der OD-Werte, wobei die Verwendung des Flagellinproteins als Beschichtungsantigen teilweise sogar höhere Werte als das Bakteriensonikat erbrachte. Flagellinproteine gehören zu den wichtigsten immunogenen Epitopen (CAWTHRAW, 1994; WIDDERS et al., 1998; LANGE et al., 1999) und die Eliminierung größerer Partikel bei ihrer Präparation ermöglicht eine sehr effiziente Plattenbeschichtung. Dennoch wurden für die weitere Entwicklung des ELISAs die Mikrotiterplatten mit **ungewaschenem Gesamt-Bakterien-sonikat** beschichtet, da für die Herstellung des Flagellinproteins im Vergleich zur Beschichtung große Mengen an Bakterien-suspension nötig waren. Bei der Verwendung von Flagellinproteinen bestand zusätzlich die Möglichkeit, wichtige antigene Strukturen wie äußere Membranproteine (BURNENS et al., 1995; JANVIER et al., 2000) zu verlieren. Um dies zu vermeiden, wurden ganze Bakterienzellen ungewaschen und beschallt eingesetzt, wodurch auch die Flagellinproteine nicht verloren gingen.

Um die **Proteinmenge** für die Antigenbeschichtung zu bestimmen, wurde die photometrische Proteinbestimmung ohne Farbreaktion eingesetzt, da diese - im Vergleich zur Methode nach LOWRY et al. (1951) bzw. der Biuretreaktion (Merckotest®) - bei dem doch heterogenen Antigen einfach und gut reproduzierbar durchzuführen war.

Als geeignete Antigen-Beschichtungskonzentration wurden 10µg Protein je ml Beschichtungssuspension ermittelt. Durch den Einsatz von höheren Konzentrationen zeigten auch Seren, die eigentlich im unteren OD-Bereich lagen, hohe Extinktionen. KEMENY (1994) beschreibt Proteinkonzentrationen zwischen 1 µg/ml und 10µg/ml als geeignet, da es hierbei zu keinen Beeinträchtigungen der Bindungen an die

Plattenoberfläche kommt. Eine mögliche Beeinträchtigung bei hohen Konzentrationen stellt die gegenseitige Bindung von Proteinen dar, die auf Grund mangelnder Platzverhältnisse an der Plattenoberfläche zu Stande kommen. Da diese Protein-Protein-Wechselwirkungen schwächer sind als die Wechselwirkungen zwischen Protein und Plattenoberfläche, besteht die Gefahr der Dissoziation des anscheinend gebundenen Proteins im Laufe des Assays.

Bei der Auswahl des **Beschichtungspuffers** erwiesen sich der Carbonatpuffer, ebenso wie die PBS-Lösung wegen unspezifischer Reaktionen der Schweineseren als ungeeignet. Demgegenüber wurden bei der Antigen-Beschichtung mit A. dest. keine unspezifischen Bindungen der Seren beobachtet. Eine Antigen-Bindung an Plastik unter Verwendung von destilliertem Wasser wird auch von KEMENY (1994) beschrieben. Auch wenn die unspezifischen Reaktionen durch die Verwendung des Blockpuffers ohne Detergens reduziert werden konnten, wurde die Beschichtung mit A. dest. wegen der einfachen und preiswerten Durchführung beibehalten.

Durch das **Einfrieren** der beschichteten Mikrotiterplatten war es möglich, eine bestimmte Menge an Testplatten als eine einheitliche, größere Charge zur Verfügung zu stellen. Die eingefrorenen Platten konnten bei Bedarf aufgetaut und unmittelbar eingesetzt werden. Eine frische Beschichtung jeder Testplatte (über Nacht) ist durchaus möglich, wobei man dann aber nur vier Wochentage für die Untersuchung von Proben zur Verfügung hat. Nach dem Auftauen der beschichteten Platten folgte das Blocken mit Magermilchpuffer (MMP) ohne die Platten zuvor zu waschen.

Es zeigte sich, wie auch von NUNC™ (2001) beschrieben, dass bei der Verwendung einer Tween®-haltigen **Waschlösung** vor dem Blocken und eines Magermilchpuffers mit Tween® höhere unspezifische Hintergrundreaktionen zu messen waren, als wenn die Platten vor dem Blocken nur ausgekippt und mit MMP ohne Tween® abgeblockt wurden. Detergenzien wie z.B. Tween® sollten erst nach dem Blocken eingesetzt werden, da sie ansonsten durch instabile Haftung vorübergehend an der Plattenoberfläche binden (NUNC™, 2001). Der Magermilchpuffer kann mit Detergenzien besetzte Bereiche nicht blocken, was zu erhöhten unspezifischen Reaktionen führt.

Die Überprüfung der **Plattenhomogenität** zeigte mit Variationskoeffizienten von 8,3% bis 10,3 % Werte, die über der 5 %-Grenze lagen, welche von NUNC™ (ESSER,

1997) für die MaxiSorp™ Zertifizierung vorgegeben wurde. In Anbetracht des verwendeten heterogenen Antigens für die Beschichtung erscheint dies aber noch tolerabel.

Einzelne Komponenten des entwickelten ELISAs können in Abhängigkeit von neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen jederzeit modifiziert werden. So könnten an Stelle des anti-IgG(H+L)-Konjugates, welches v.a. mit IgG aber - wegen der ebenfalls stattfindenden Bindung an leichte Ketten - auch mit anderen Ig-Klassen reagiert, (Sub)Klassenspezifische Konjugate verwendet werden. In Bezug auf das Antigen wäre vorstellbar, dass die heterogene Beschichtung durch ein hochspezifisches rekombinantes Protein ersetzt werden kann.

### **V.2 Serologische Untersuchungsergebnisse von Feldproben und Proben der immunisierten Impfschweine**

Durch die Immunisierung der Schweine konnten gegen C.c. und gegen C.jej. gerichtete Hyperimmunseren gewonnen werden. Die ermittelten Antikörper-Spiegel der Versuchsschweine nach wiederholter parenteraler Immunisierung lagen um ein Vielfaches höher als die Werte der untersuchten Feldproben.

Für die Verdünnungen der Feldproben waren bei den Seren sowohl die 1:100 als auch die 1:400 Verdünnung möglich. Für die Verdünnung der Fleischsaftproben erwiesen sich die 1:30 und die 1:100 Verdünnung als gleichermaßen geeignet. Welche Verdünnungen der Proben zum Einsatz kommen, kann je nach „gewünschtem“ OD-Bereich der Ergebnisse gewählt werden. Die 1:100 Verdünnung für Fleischsaft sowie die 1:400 Verdünnung für Seren führten zu OD-Werten in einem Bereich von etwa 0,2 bis 0,8. Wurden die entsprechenden Proben nur 1:30 bzw. 1:100 verdünnt, so lagen die Werte etwa zwischen 0,8 und 1,2. In beiden Fällen entsprachen die Messwerte der Seren damit dem Bereich der entsprechend verdünnten „Null“- bzw. Ausgangsseren der immunisierten Schweine, d.h. die C.-Antikörperspiegel in Feldseren lagen bei den untersuchten Proben meist in einem mittleren Bereich. OD-Werte, wie sie von den Schlachtseren und den

Fleischsaftproben der Impfschweine erreicht wurden, konnten bei den Feldproben nicht nachgewiesen werden.

Auch die untersuchten Mutterschweine zeigten keine auffallend hohen Werte. Demgegenüber lagen die untersuchten Ferkelseren (von Ferkeln mit einem Gewicht bis zu 25kg) deutlich im niedrigen OD-Bereich (<0,3).

Kreuzreaktivitäten mit einem weiteren thermophilen *Campylobacter*stamm (*C.lari*) und den Deckseuchenerregern (*C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus*) waren bei den Hyperimmunseren der Impfschweine, vor allem bei den mit *C.jej.* immunisierten Tieren, nachzuweisen. Möglicherweise exprimieren diese *C. spp.* Antigene/Epitope, die ähnlich denen von *C.c.* und *C.jej.* sind und von den Hyperimmunseren erkannt werden.

Feldseren sowie auch die „Null“- bzw. Ausgangsseren der Versuchsschweine zeigten hingegen kaum Kreuzreaktivität mit den *Campylobacter*-Deckseuchenerregern.

Durch die deutliche Abnahme der OD-Werte bei der Präadsorption der Hyperimmunseren mit dem homologen *C.* Antigen im Vergleich zu der Kontroll-„Präadsorption“ mit *A. dest.* konnte die Spezifität der gewonnenen Seren gezeigt werden. Untermauert wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch die weitgehend ausgebliebene Präadsorption derselben Seren mit einer *E.coli*-Suspension, die praktisch keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit der Antikörper an *C.*-beschichtete Platten hatte.

Obwohl die thermostabilen *C.*-Antigene den O-Antigenen anderer gramnegativer *Enterobacteriaceae* ähneln (PENNER et al., 1983; PERREZ-PERREZ et al., 1986; JOHANSEN et al., 1995), weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass durch die Immunisierung hochspezifische *C.*-Hyperimmunseren gewonnen wurden .

Es standen für die Testentwicklung keine definierten Negativseren zur Verfügung, da auch kommerzielle Versuchstierzuchten (z.B. Charles River, Sulzfeld) bei ihren Schweinen keine Untersuchung auf *C.*-Antikörper durchführen (KUHN, pers. Mitteilung, 2001).

Die Tatsache, dass die Ferkelseren mit **allen** untersuchten *C. spp.* sehr niedrige Werte aufwiesen und die Feldseren nur schwach mit den Deckseuchenerregern (*C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus*) kreuzreagierten, mit *C.c.* und *C.jej.* aber

im mittleren OD-Bereich lagen, weist darauf hin, dass hier durchaus eine Immunreaktion stattgefunden hat. Dies wird auch dadurch belegt, dass die Impfschweine zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung C. ausschieden und ihre Nullseren ebenfalls mittlere OD-Werte aufwiesen, die demzufolge nicht als negativ angesprochen werden können.

Die humorale Immunantwort nach einer C.-Feldinfektion scheint also nicht mit einer Antikörperbildung durch eine parenterale Immunisierung vergleichbar zu sein. Bei Feldinfektionen mit C. könnte beim Schwein ebenso wie beim Menschen (LANE et al., 1987; CAWTHRAW, 2000) die sekretorische Antikörperbildung im Vordergrund stehen. Das Mukosa-assoziierte Immunsystem (MALT) mit den IgA-Plasmazellen ist für die Sekretion von IgA verantwortlich. IgA schützt epitheliale Oberflächen vor einer Anheftung und Invasion von pathogenen Keimen. Der Schwerpunkt der Immunantwort des Schweines auf eine C.-Infektion liegt wahrscheinlich mehr auf sekretorischer als auf humoraler Ebene.

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beim Menschen (NEWELL und NACHAMKIN, 1992), beim Frettchen (BELL und MANNING, 1990) und beim Geflügel (SCHULZE und ERLER, 2002) die gebildeten Antikörper gegen C. zwar vor einer Erkrankung, aber nicht vor einer Reinfektion schützen.

Interessanterweise konnten auch bei den immunisierten und in hygienischer Hinsicht sehr gut gehaltenen Impfschweinen am Schlachttag trotz sehr hoher Antikörpertiter C. im Kot nachgewiesen werden, d.h. auch Serum-Antikörperspiegel, die nach natürlicher Infektion kaum zu erreichen sind, führen nicht zu einer Elimination der Erreger.

Für die Bestimmung der C. Antikörper wurden neben den Routineeinsendungen zur Bestimmung der Salmonellenantikörper auch Serumeinsendungen untersucht, die zur Prüfung auf andere Parameter (PRRS- Antikörper, Aujeszky-Antikörper) eingeschickt worden waren. Betriebe, die Proben zur Salmonellen-Antikörperbestimmung einschickten, unterlagen wahrscheinlich einem übergeordneten Hygieneprogramm und zeigten bei der Bestimmung von C.-Antikörpern meist niedrigere OD-Werte als Betriebe, deren Proben aus einem anderen Grund zur Untersuchung eingeschickt wurden. Eine Beziehung zwischen Salmonellen-Ak Ergebnissen und C.-Ak Ergebnissen konnte jedoch bei der Untersuchung der begrenzten Probenzahl nicht nachgewiesen werden. So zeigten Salmonellen positive Proben im allgemeinen keine

über dem Durchschnitt liegenden C.-Ak.-OD-Werte. Umgekehrt waren die wenigen Proben mit vergleichsweise hohen C.-Ak.-OD-Werten meist Salmonellen-Ak. negativ. Auch bei Betrachtung aller Proben einer Einsendung lagen die C.-Ak.-OD-Werte von Einsendungen mit positiven Salmonellen-Ak-Ergebnissen im Vergleich zu negativen Einsendungen nicht in einem erhöhten C.-Ak.-OD-Bereich. Um diese Beobachtung bestätigen zu können, müssen aber weitere Untersuchungen mit umfangreicheren Probenzahlen durchgeführt werden.

### **V.3 Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter beim Schwein**

Schweine zählen, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, zu latenten Trägern und Ausscheidern von thermophilen C.. In Europa scheint im Gegensatz zu anderen Kontinenten meist eine C.c.-Infektion vorzuliegen (GAULL et al., 2001; WUTHE und VOLKHEIMER, 1986; SCHNÖTZLINGER, 1994), aber auch das Vorkommen von C.jej. (GÖRGEN, 1982; STICHT-GROH, 1982; WEBER et al., 1985) und eine Mischinfektion mit beiden Erregern (MADDEN et al., 2000) wurden nachgewiesen. Dabei waren in Deutschland 48-100% der untersuchten Kotproben aus gesunden Masttieren und Schlachtschweinen C.-positiv (STICHT-GROH, 1982; GÖRGEN et al., 1983; WEBER et al., 1985; GAULL et al., 2001). In Holland wurden bei 85% der Mastschweine C. nachgewiesen (WEIJTENS et al., 1993) und SCHNÖTZLINGER stellte in Österreich bei 70% der Schlachtschweine C. fest.

Auch aus Sammelkotproben der Impfschweine konnten zu Beginn der Immunisierung und am Schlachttermin (trotz hoher Antikörpertiter) C.c. isoliert werden, wobei die Tiere aber klinisch unauffällig waren. Manifeste C.-Infektionen des Schweines werden aber nur selten beschrieben und sogar nach experimentellen Infektionen von Kolostrum-frei aufgezogenen Ferkeln waren nur leichte Enteritiden zu beobachten (OLUBUNMI und TAYLOR, 1982). GÖRGEN et al. (1983) beschreiben, dass an Enteritis erkrankte Schweine nicht mehr C. im Kot ausschieden als klinisch gesunde Tiere. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zwar die meisten Schweinebestände mit thermophilen C. und dabei in Deutschland wahrscheinlich am häufigsten mit C.c. infiziert sind, klinische Symptome aber meist ausbleiben. GÖRGEN et al. (1983) und WEBER et al. (1985) sehen C. sogar als Bestandteil der normalen Darmflora beim Schwein an. WEIJTENS et al. (1999) berichteten von einer

Resistenz des Intestinaltraktes gegen C. bei sonst gesunden erwachsenen Schweinen und einer Abnahme der ausgeschiedenen C.-Menge mit zunehmendem Alter der Tiere.

Wird jedoch in Zukunft auch auf dem Schweinesektor vermehrt dazu übergegangen, alternative Haltungsformen auszubauen, könnte eine C.-Problematik entstehen. In einer Studie von WILLIS et al. (2002) wurde der Einfluss von Haltungsformen von Junghühnern auf die Besiedelung und Ausscheidung von C. untersucht. Tiere in Bodenhaltung, die direkten Kontakt zu ihrem Kot hatten, schieden im Gegensatz zu Vergleichstieren, die in Käfigen aufgestellt worden waren, nach acht Monaten noch C. aus. Würden Schweine vermehrt in alternativen Haltungsformen aufgestellt werden, könnte sich der Keimdruck, dem die Tiere ausgesetzt sind, erhöhen.

Denkbar wäre dann durch den erhöhten Infektionsdruck eine Zunahme der C.-Keimzahlen im Darm, in den Organen und an den Schlachttierkörpern selbst, wodurch dann ein größerer Schwerpunkt auf die Antigenuntersuchung gelegt werden müsste. Eine derartige Zunahme würde zu Problemen führen, da eine Dekontamination von Fleisch nach der Ansicht von WEIJTENS et al. (1997) vom Verbraucher weitgehend abgelehnt wird. WEIJTENS et al. (1997) sehen deshalb die Notwendigkeit einer Elimination von C. aus den Schweinebeständen, um das Risiko des Menschen, sich durch den Verzehr von Schweinefleisch mit C. zu infizieren, senken zu können.

Wie auf dem Geflügelsektor von SKIRROW (1991) beschrieben, kann die Inzidenz der humanen C.-Infektionen durch eine Verminderung der Infektionen von Tierbeständen erreicht werden. C. freie Schweinebestände aufzubauen wäre aber ein sehr zeit-, arbeits- und geldaufwendiges Unterfangen, da nach Untersuchungen u.a. von GAULL et al. (2001) davon ausgegangen werden muss, dass die Inzidenz an C.-Infektionen in deutschen Schweinebetrieben sehr hoch (bis zu 93% bei Mastschweinen, bis 100% bei Muttersauen) ist. C.-Infektionen bei Schweinen laufen primär ohne klinische Erscheinungen ab und führen zu keinen direkten nennenswerten Einbußen auf Seiten der Schweineproduzenten. Ihnen die Notwendigkeit der Eliminierung von C. aus ihren Beständen zu erklären, würde sicher einige Probleme bereiten; vor allem dann, wenn sie die dadurch entstehenden Kosten

selber tragen müssten. Diese direkt an den Verbraucher weiterzugeben würde wahrscheinlich an der Konkurrenzfähigkeit mit importiertem Schweinefleisch scheitern.

Da die Ferkel, wie von WEIJTENS et al. (1997) beschrieben, durch die Muttersauen infiziert werden, müssten C.-freie Muttersauenpopulationen aufgebaut werden (WEIJTENS et al., 2000). Solche C.-freien Schweine, respektive SPF-Schweine im größeren Stil zu bekommen, würde sicherlich schon die erste große Hürde darstellen. WEIJTENS et al. (1997) halten die Möglichkeit der Separation von neugeborenen Ferkeln von ihren Müttern und anderen infizierten Tieren in der kommerziellen Schweinehaltung für unrealistisch.

Wären solche Tiere in größerem Umfang verfügbar, könnten Mastbetriebe durch bereits praktizierte Rein-Raus-Verfahren und ein sehr strenges Hygienemanagement unter Umständen C.-freie Bestände aufrechterhalten. An finanziellen Aufwendungen würden Anschaffungskosten für C.-freie Tiere, Kosten für Dekontaminationsmaßnahmen, sowie für bakteriologische und serologische Untersuchungen für die Überwachung des C. Status anfallen. Hier wäre der Einsatz des entwickelten C.-Antikörper-ELISAs zur Herdendiagnostik denkbar. Mit C. infizierte Bestände könnten so identifiziert und nach erfolgter Bekämpfung überwacht werden.

Um C.-Infektionen des Menschen durch den Verzehr von Geflügelfleisch zu minimieren, wurden von SCHULZE und ERLER (2002) zwei Strategien beschrieben. Die erste basierte auf der Verbesserung der Schlachthygiene, die zweite auf einer Minimierung des C.-Eintrages in die Nahrungsmittelkette durch gesunde Tierbestände. Die von der Geflügelschlachtung abweichende Schweineschlachtpraxis führt durch den Kühlvorgang von Schweinehälften zu einer Minimierung der C.-Menge an der Oberfläche der Tierkörper (OOSTEROM et al., 1983).

C.-Infektionen des Menschen konnten meist auf den Verzehr von Geflügel- und nicht auf den Verzehr von Schweinefleisch zurückgeführt werden. KRAMER et al. (2000) untersuchten die Übereinstimmung der isolierten Serotypen zwischen Human- und Tierisolaten. Dabei zeigte sich, dass C.-Geflügelisolate im Gegensatz zu den C.-Schweineisolaten sehr häufig mit den C.-Humanisolaten übereinstimmten. Der Eintrag von porcinen C.-Stämmen ist demnach derzeit von untergeordneter Bedeutung.

#### **V.4 Antikörper-Antwort auf eine Campylobacter-Infektion**

Wie sich in den untersuchten Serumproben von Ferkeln bis 25 kg Körpergewicht zeigte, waren bei Tieren dieser Altersklasse keine nennenswerten C.-Antikörper-Spiegel zu messen. Bei Geflügel hingegen wurde von einem deutlichen maternalen C.-Antikörper-Spiegel bei Küken berichtet, der bis zum 15. Lebenstag wieder abfiel. Wie eine experimentelle Infektion zwei Tage alter Küken zeigte, schützten entweder maternale Antikörper die Tiere in gewisser Weise vor einer Infektion oder das Darmmilieu bot durch eine Erstbesiedelung mit aeroben Keimen nicht die Bedingungen, die für das Wachstum von C. notwendig gewesen wäre. Ansteigende IgG-Spiegel schützten bei der Untersuchung von Küken (SCHULZE und ERLER, 2002) nicht vor einer Kolonisation mit C.. Nach experimenteller oraler Infektion von Küken mit C. konnte trotz angestiegener IgG-Spiegel nahezu keine Reduktion der Zäkumkeimzahlen festgestellt werden. Dies konnte auch bei den Impfschweinen beobachtet werden: Im Verlauf der dreimaligen Immunisierung entwickelten sie durchwegs sehr hohe Antikörperspiegel; es konnten aber aus Kotproben am Schlachttag wie schon zu Beginn der Immunisierung C.c. isoliert werden. Beim Kaninchen wurde hingegen in einer Untersuchung von BURR et al. (1988) durch steigende IgA-Spiegel ein Schutz vor einer Kolonisation und Bakteriämie festgestellt.

#### **V.5 Mögliche Bereiche für den Einsatz des entwickelten Testsystems und Ausblick**

Ein Einsatz des entwickelten ELISA zur Untersuchung von Schweineseren auf C.-Ak analog der Untersuchung auf Salmonellen-Antikörper ist trotz der „geringen“ humoralen AK-Bildung vorstellbar, wenn das Ziel in der Schweinehaltung angestrebt werden sollte, C. völlig aus den Beständen zu eliminieren. Um eine Übersicht über infizierte Bestände zu erhalten, könnte die serologische Bestimmung bzw. die Bestimmung von C.-Antikörpern in Fleischsaft Informationen über die Belastung der Schweinebestände mit C. liefern und damit Hinweise auf einen möglichen Eintrag in die Lebensmittelkette geben. Die Bestände könnten, vergleichbar mit den Salmonellen-Antikörperuntersuchungen, regelmäßig auf C.-Antikörper untersucht werden. Beide Untersuchungen könnten mit den gleichen Proben durchgeführt

werden, wobei keine zusätzlichen Kosten für die Probennahme und den Versand anfallen würden.

Dazu ist aber eine Bewertung des Antikörper-ELISAs mit Festlegung eines cut-off Wertes (wie z.B. bei den Salmonellen-Antikörper-Untersuchungen) bzw. von Toleranzgrenzen Voraussetzung. Eine solche Wertung der untersuchten Proben war im Rahmen der vorliegenden methodischen Arbeit nicht möglich, da dies im Idealfall die Verfügbarkeit von Serumantikörpern von peroral infizierten Schweinen voraussetzen würde. Die Grundlage hierfür wäre ein Tierversuch mit SPF Schweinen, in dem mehrere Schweine peroral mit unterschiedlichen Mengen an C. infiziert werden. Die Entwicklung der Antikörperspiegel der einzelnen Tiere müsste regelmäßig überwacht werden und somit würden serologische Ergebnisse einer „natürlichen“ C. Infektion zur Verfügung stehen. Anhand dieser Daten wäre es dann möglich, die gemessenen OD-Werte von Feldproben, in positive, grenzwertige und negative Ergebnisse einzuteilen.

Für das Geflügel wurden zwei ähnlich aufgebaute indirekte ELISA-Verfahren entwickelt, wobei SAHIN et al. (2001) als Negativkontrolle das Serum von SPF-Tieren und als Positivkontrolle das Serum von C.-positiven Elterntieren mit einem OD-Wert > 1,5 verwenden; Proben ab einem Mittelwert der Negativkontrollen + die dreifache Standardabweichung sprechen sie als positiv an. SCHULZE und ERLER (2002) dagegen verwenden als Negativkontrolle Kükenserum (Küken bis zu einem Alter von 4 Wochen) und als Positivkontrolle Serum von C.-positiven Legehennen.

Sollte eine orale Immunisierung mit SPF-Schweinen nicht möglich sein, könnten Ferkelserum (evtl. nach zusätzlicher Präadsorption) als Negativkontrollen verwendet werden. Mit den Hyperimmunserum der Impfschweine stehen alternative Positivkontrollen zur Verfügung, die durch entsprechende Verdünnungen auch das Erstellen einer Regressiongeraden (analog zum Salmonellentest) ermöglichen. Damit könnten die Probenextinktionen bestimmten Bereichen wie tolerabel/nicht tolerabel zugeordnet werden, wobei aber unverändert das Problem der Festsetzung solcher Bereiche besteht. Bei der beschriebenen hohen Infektionsrate der Bestände mit C. wäre auch ein stufenweises Absenken des Toleranzbereiches denkbar. Auch wenn die untersuchten Proben meist höhere Extinktionen als die Serum junger Ferkel aufwiesen, können aufgrund der geringen untersuchten Bestandszahlen keine epidemiologischen Aussagen getroffen werden. Am STUA Aulendorf wird ein

weitergehendes Projekt durchgeführt, dessen Ziel u.a. in der parallelen Untersuchung von C.-Antigen und C.-Antikörper liegt.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Campylobacter-Infektionen sind nach Salmonellen-Infektionen die zweithäufigste Ursache bakterieller Darmerkrankungen des Menschen. Lebensmittel sind eine wichtige Infektionsquelle und Schweine sowie Geflügel gelten als latent infiziert, was für die Erkrankung beim Menschen von epidemiologischer Bedeutung sein kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und exemplarische Anwendung eines Enzym-Immuno-Assays (ELISA) zum Nachweis porciner Campylobacter-Antikörper in Blutserum und Fleischsaftproben, um durch sie die Durchseuchung von Schweinebeständen erkennen und entsprechende Gegenmaßnahmen ergreifen zu können. Für diesen Test wurden:

- A. Durch parenterale Anwendung einer selbst hergestellten Campylobacter Vakzine positive Kontroll-Antiseren hergestellt. Kommerzielle Seren waren nicht erhältlich.
- B. Verschiedene Campylobacter Stämme, unterschiedliche Antigenaufbereitungs- und -beschichtungsmethoden sowie unterschiedliche Verdünnungen von Serum, Fleischsaft und Konjugat überprüft. Die Ergebnisse zeigen:
  - Kreuzreaktionen der Seren gegen *C. coli* und *C. jejuni* Antigen, was eine Beschichtung mit einem Mischantigen aus beiden Stämmen sinnvoll erscheinen lässt.
  - Der Test ist spezifisch, denn eine Präadsorption von Immuserum an den homologen Campylobacter Stamm führte im Test zu deutlich geringeren ODs. Außerdem fand an *Escherichia coli* Antigen nahezu keine Präadsorption statt.
  - Der Variationskoeffizient betrug bei der Überprüfung der Plattenhomogenität der Beschichtung bei einer mittleren OD von 1,2 bis 1,3 zwischen 8-10%.
  - Das Einfrieren antigenbeschichteter Platten hat keinen Qualitätsverlust zur Folge, so dass auf diese Weise größere Chargen vorbereitet werden können.
  - Für die Ergebnisbewertung ist das Mitführen einer abgekürzten Verdünnungsreihe von positivem Kontrollserum erforderlich, denn bei dem in rage kommenden Untersuchungsgut von Mast- und Mutterschweinen sind definierte negative Seren nicht erhältlich.

C. Bei nahezu allen Feldproben konnten Antikörper gegen *C. coli* und *C. jejuni* Antigene nachgewiesen werden. Die Antikörperspiegel der 1:400 verdünnten Feldserumproben sowie auch der 1:400 verdünnten „Null“- bzw. der Ausgangsseren der experimentellen Serumschweine lagen je nach Kontrolltitration im unteren bis mittleren OD-Bereich (OD 0,25-0,70), während die OD-Werte bei den 1:400 verdünnten Hyperimmunseren zwischen 2,0 und 2,7 lagen. In 1:400 verdünnten Serumproben von Ferkeln bis 25 kg Körpergewicht konnten bei allen untersuchten *Campylobacter*-Stämmen nur sehr geringe Antikörpertiter festgestellt werden (OD-Bereich zwischen 0,028-0,324).

Kreuzreaktionen mit anderen *Campylobacter*-Stämmen (*C. fetus* ssp. *fetus* und *C. fetus* ssp. *venerealis*) waren bei den 1:100 bzw. 1:400 Gebrauchsverdünnungen der Hyperimmunseren der Impfschweine in geringerer Deutlichkeit noch erkennbar.

Aus den Ergebnissen wird gefolgert, dass beim Schwein zwar eine Immunreaktion auf eine *Campylobacter*-Infektion stattfindet; diese führt unter natürlichen Bedingungen jedoch nur zu geringen Antikörper-Spiegeln. Selbst eine deutliche humorale Immunantwort schützt jedoch offensichtlich nicht vor *Campylobacter* Infektionen, denn die Versuchstiere schieden sowohl zu Beginn der Immunisierung als auch am Schlachttag *C. coli* aus.

Da keine Serumantikörper von peroral infizierten SPF-Schweinen zur Verfügung standen, aber von einer *Campylobacter* Infektion der meisten Schweinebestände ausgegangen werden muss, bestand im Rahmen der vorliegenden vorwiegend methodischen Arbeit die Schwierigkeit, für die endgültige Beurteilung der Ergebnisse einen Grenzwert festzulegen. Hierzu sind weitergehende epidemiologische Untersuchungen nötig, die auch die *Campylobacter*-Ausscheidung im Herkunftsbetrieb und/oder die *Campylobacter*-Belastung der Schlachttierkörper bzw. der Organe mit einbeziehen.

Ferkelseren können (evtl. nach zusätzlicher Präadsorption) als Negativkontrollen verwendet werden und mit den Hyperimmunseren der Impfschweine stehen alternative Positivkontrollen zur Verfügung, die durch entsprechende Verdünnungen

auch das Erstellen einer Regressionsgeraden ermöglichen. Damit könnten die Probenextinktionen bestimmten Bereichen wie tolerabel/nicht tolerabel zugeordnet werden. Unverändert besteht aber weiterhin das Problem der Festsetzung solcher Bereiche.

## **VII. SUMMARY**

### **Development and Application of an Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) in Serum and Meat Juice Samples for the Evaluation of the Campylobacter Status in Piggeries**

#### **Summary**

In man campylobacter infections are the second most common cause of bacterial enteritis after salmonella infections. Foodstuffs are an important source of infection. Pigs as well as poultry are considered latently infected, a finding which could be of considerable epidemiological importance in human disease.

The objective of this work was the development and exemplary application of an enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) test system to enable the detection of antibodies to porcine campylobacter in serum and meat juices. Such a reagent/test system could help to clarify the infectious state of pig farms and could thus assist in taking preventive measures. Towards achieving this aim the following work was undertaken:

- A. Production of positive control antiserum by parenteral application of a campylobacter vaccine which was made as part of this work.
- B. Testing of various campylobacter strains as, of different processing and coating methods as well as varying dilutions of serum, meat juices and conjugate. The results were as follows:
  - Serological cross-reaction between *C. coli* and *C. jejuni* antigen were detected, thus justifying coating of the plate with a mixed antigen of both strains.
  - To confirm the specificity of the test, pre-adsorption of immune serum with the homologous campylobacter strain was performed and resulted in noticeably lower ODs whereas there was almost no pre-adsorption with *Escherichia coli* antigen.

- When testing the plates for coating for homogenous levels of coating the coefficient of variation at a mean OD of 1.2 to 1.3 was 8 -10%.
  - Freezing of antigen coated plates was proven not to result in lowered quality, and thus the preparation of larger batches was permissible.
  - The simultaneously running of a shortened dilution row with positive control serum was found to be necessary as there are no defined negative control sera available for the group of fattening and breeding pigs under investigation. This procedure facilitated the evaluation of the test results.
- C. Antibodies against *C. coli* and *C. jejuni* antigens could be demonstrated in almost all field samples. However, the antibody levels of the 1:400 diluted field serum samples as well as of the 1:400 diluted “zero” and initial serum samples from the vaccinated pigs resulted in low or medium ODs (0.25-0.70) after control titrations, whereas the ODs of the 1:400 diluted hyperimmune serum was between 2.0 and 2.7. In piglets of a body weight of less than 25 kg only very low antibody levels (ODs ranging between 0.028 – 0.324) could be demonstrated with all campylobacter strains used.

Serological cross-reactions with other campylobacter strains (*C. fetus* ssp *fetus* and *C. fetus* ssp *venerealis*) could be detected if the hyperimmune serum of the vaccinated pigs was diluted to a working dilution.

We conclude from the results that pigs react to campylobacter infections by mounting an immune reaction. Under natural conditions, however, the resulting antibody level is low. Apparently, even a detectable humoral immune response does not protect against campylobacter infection because the immunised pigs shed *C. coli* both at the beginning of immunisation and on the day of slaughter.

Within the scope of this predominantly methodological study we found it difficult to define a clear cut-off value for final evaluation of the results. Positive serum from orally infected SPF pigs was not available to assist, and further most piggeries must be considered infected. Therefore, further epidemiological investigations are required which include campylobacter excretion in the place of origin and/or the campylobacter load of carcass resp. organs.

Serum from piglets (possibly best after additional pre-adsorption) may be used as negative control serum while hyperimmune serum from vaccinated pigs may serve as positive control serum. These can both be used for the establishment of a regression line by employment of a serial dilution row. This may facilitate the classification of sample extinctions into tolerable/not tolerable. However, at present the problem of defining the cut-off value remains to be solved.

## VIII. ANHANG

### VIII.1 Untersuchungsergebnisse der Serumproben der sechs zur Antikörpergewinnung vakzinierten Schweine

In den **Tabellen 30 bis 47** sind die Titrationsen der Serumproben der vakzinierten Schweine auf C.c., C.jej. und Mix (C.c./C.jej.) beschichteten Platten vergleichend dargestellt.

**Tabelle 30 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 1 (931) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 1				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,135	2,308	2,859	2,529	3,464
2,0	1,198	1,964	2,421	2,264	3,221
2,3	0,787	1,922	2,047	1,797	3,058
2,6	0,459	1,617	2,064	2,058	2,832
2,9	0,352	1,378	2,089	1,664	2,435
3,2	0,190	1,435	1,713	1,493	2,113
3,5	0,110	0,841	1,599	1,346	1,978
3,8	0,068	0,560	1,225	1,275	1,674
4,1	0,038	0,419	1,009	0,860	1,233
4,4	0,023	0,186	0,897	0,425	0,955
4,7	0,018	0,121	0,629	0,326	0,599
5,0	0,011	0,057	0,309	0,198	0,384

**Tabelle 31 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 1 (931) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 1				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,950	2,124	2,015	2,689	2,899
2,0	0,756	2,081	1,916	1,652	2,829
2,3	0,704	1,488	2,040	1,534	2,116
2,6	0,398	1,543	1,600	1,385	1,800
2,9	0,284	0,993	1,594	1,330	1,883
3,2	0,163	1,090	1,272	1,201	1,605
3,5	0,131	0,800	1,086	1,050	1,279
3,8	0,054	0,406	0,952	0,648	1,140
4,1	0,029	0,268	0,848	0,450	0,780
4,4	0,019	0,124	0,781	0,328	0,440
4,7	0,010	0,082	0,477	0,160	0,259
5,0	0,009	0,041	0,211	0,064	0,100

**Tabelle 32 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 1 (931) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.-Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 1				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,203	2,078	2,130	2,231	3,043
2,0	0,876	1,714	1,866	1,961	2,764
2,3	0,578	1,467	1,808	1,840	2,573
2,6	0,401	1,347	1,631	1,544	2,467
2,9	0,313	1,180	1,379	1,564	2,219
3,2	0,156	0,999	1,594	1,764	1,965
3,5	0,104	0,632	1,474	1,456	1,653
3,8	0,047	0,494	1,285	1,061	1,499
4,1	0,025	0,235	1,021	0,818	0,919
4,4	0,017	0,174	0,733	0,441	0,872
4,7	0,010	0,070	0,513	0,253	0,504
5,0	0,008	0,047	0,320	0,125	0,302

**Tabelle 33 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 2 (916) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 2				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,045	1,258	2,341	2,731	3,037
2,0	1,031	1,609	2,220	2,394	2,796
2,3	0,561	1,203	1,887	2,265	2,649
2,6	0,648	1,259	1,817	2,044	2,757
2,9	0,512	1,161	1,611	2,102	2,153
3,2	0,384	1,003	1,222	1,624	1,906
3,5	0,313	0,787	1,618	1,520	1,515
3,8	0,177	0,605	1,407	1,351	1,689
4,1	0,102	0,472	1,079	1,142	1,449
4,4	0,046	0,258	0,987	0,931	1,043
4,7	0,046	0,155	0,795	0,616	0,769
5,0	0,030	0,094	0,642	0,521	0,567

**Tabelle 34 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 2 (916) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 2				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,938	1,686	2,512	3,102	3,190
2,0	0,785	1,225	2,150	2,617	2,883
2,3	0,655	1,295	1,999	2,258	2,612
2,6	0,575	1,229	1,647	1,914	2,546
2,9	0,345	1,022	1,295	1,752	2,187
3,2	0,380	0,817	1,262	1,435	1,939
3,5	0,177	0,707	1,303	1,234	1,471
3,8	0,139	0,544	1,022	1,045	1,203
4,1	0,080	0,341	0,778	0,908	1,042
4,4	0,038	0,172	0,627	0,596	0,613
4,7	0,029	0,098	0,476	0,337	0,439
5,0	0,017	0,055	0,284	0,172	0,182

**Tabelle 35 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 2 (916) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.-Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 2				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,801	1,489	2,309	2,394	2,701
2,0	0,879	1,347	2,036	2,178	2,567
2,3	0,677	1,375	1,687	2,196	2,363
2,6	0,528	0,990	1,575	1,984	2,251
2,9	0,576	1,067	1,547	1,692	1,830
3,2	0,308	1,197	1,125	1,294	1,951
3,5	0,253	0,651	1,339	1,448	1,659
3,8	0,161	0,621	1,259	1,212	1,425
4,1	0,108	0,386	0,949	0,956	1,224
4,4	0,058	0,285	0,934	0,704	0,973
4,7	0,035	0,110	0,410	0,467	0,561
5,0	0,020	0,060	0,391	0,308	0,300

**Tabelle 36 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 3 (1000) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 3				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,889	1,956	3,041	3,164	3,505
2,0	1,180	1,944	2,535	2,736	3,322
2,3	0,818	1,596	2,629	2,668	3,199
2,6	0,683	1,636	2,470	2,324	3,169
2,9	0,627	1,348	1,947	2,010	2,756
3,2	0,597	1,362	1,651	2,020	2,575
3,5	0,395	1,016	1,611	1,608	2,263
3,8	0,246	0,686	1,203	1,027	1,894
4,1	0,103	0,405	1,040	0,906	1,549
4,4	0,057	0,191	0,729	0,415	0,930
4,7	0,032	0,109	0,454	0,261	0,565
5,0	0,026	0,077	0,288	0,100	0,358

**Tabelle 37 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 3 (1000) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 3				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,869	1,784	2,355	2,474	3,100
2,0	0,780	1,539	2,270	2,267	2,766
2,3	0,768	1,422	1,933	1,895	2,709
2,6	0,410	1,133	1,809	1,684	2,719
2,9	0,399	1,092	1,455	1,380	2,057
3,2	0,236	0,923	1,598	1,194	2,004
3,5	0,231	0,824	1,049	0,944	1,403
3,8	0,123	0,461	0,967	0,675	1,094
4,1	0,075	0,305	0,815	0,497	0,829
4,4	0,046	0,172	0,640	0,312	0,554
4,7	0,025	0,104	0,440	0,179	0,331
5,0	0,016	0,054	0,268	0,121	0,191

**Tabelle 38 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 3 (1000) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 3				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,961	1,782	2,578	2,785	3,104
2,0	0,942	1,654	2,511	2,638	3,047
2,3	0,718	1,269	2,201	2,457	2,708
2,6	0,693	1,144	1,991	1,985	2,477
2,9	0,492	1,073	1,787	1,966	2,390
3,2	0,272	1,101	1,733	1,594	1,942
3,5	0,228	0,930	1,465	1,213	1,484
3,8	0,187	0,512	1,406	0,875	1,427
4,1	0,125	0,280	0,751	0,506	0,957
4,4	0,064	0,166	0,538	0,400	0,714
4,7	0,032	0,129	0,471	0,143	0,474
5,0	0,025	0,062	0,333	0,149	0,334

**Tabelle 39 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 4 (921) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 4				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,595	2,432	2,845	3,280	3,334
2,0	1,345	2,225	2,447	2,836	3,121
2,3	1,058	1,673	2,155	2,420	2,918
2,6	0,751	1,480	1,786	2,064	2,430
2,9	0,870	0,993	1,598	1,708	2,103
3,2	0,435	1,014	1,239	1,517	1,784
3,5	0,296	0,663	0,693	0,911	1,355
3,8	0,159	0,340	0,523	0,585	1,090
4,1	0,098	0,263	0,300	0,271	0,705
4,4	0,052	0,143	0,164	0,174	0,433
4,7	0,040	0,094	0,093	0,101	0,274
5,0	0,024	0,055	0,053	0,062	0,099

**Tabelle 40 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 4 (921) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 4				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,865	1,971	2,631	2,760	3,086
2,0	1,290	1,830	2,288	2,337	3,006
2,3	1,064	1,581	1,777	2,084	2,789
2,6	0,834	1,086	2,010	2,057	2,508
2,9	0,716	1,003	1,551	1,543	2,099
3,2	0,441	0,991	0,987	1,121	1,574
3,5	0,309	0,839	0,709	0,681	1,184
3,8	0,191	0,471	0,422	0,483	0,758
4,1	0,083	0,274	0,265	0,225	0,719
4,4	0,050	0,142	0,155	0,161	0,303
4,7	0,038	0,097	0,081	0,061	0,155
5,0	0,019	0,064	0,040	0,039	0,124

**Tabelle 41 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 4 (921) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 4				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,071	1,808	2,308	2,426	3,034
2,0	1,161	1,631	2,142	2,309	2,809
2,3	0,910	1,536	1,924	1,986	2,470
2,6	0,784	1,370	1,649	1,634	2,247
2,9	0,609	1,183	1,466	1,541	2,031
3,2	0,439	0,862	1,099	1,062	1,577
3,5	0,296	0,697	0,683	0,609	1,413
3,8	0,163	0,472	0,489	0,390	1,011
4,1	0,101	0,240	0,248	0,219	0,615
4,4	0,053	0,146	0,125	0,124	0,301
4,7	0,033	0,093	0,083	0,058	0,209
5,0	0,029	0,057	0,052	0,038	0,088

**Tabelle 42 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 5 (981) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 5				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,674	2,276	3,237	3,176	3,588
2,0	1,572	2,199	2,885	2,980	3,220
2,3	1,222	1,563	2,589	2,678	3,157
2,6	0,881	1,414	2,524	2,505	2,993
2,9	0,620	0,933	2,256	2,166	2,830
3,2	0,429	0,831	1,740	1,762	2,437
3,5	0,247	0,452	1,521	1,196	1,746
3,8	0,141	0,286	1,118	0,813	1,339
4,1	0,081	0,130	0,626	0,472	0,890
4,4	0,059	0,081	0,395	0,223	0,550
4,7	0,031	0,059	0,238	0,141	0,263
5,0	0,023	0,030	0,116	0,071	0,175

**Tabelle 43 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 5 (981) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 5				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,213	2,070	3,073	3,271	3,171
2,0	1,128	1,581	2,492	2,540	3,088
2,3	0,744	1,319	2,554	2,433	2,812
2,6	0,636	1,261	2,071	2,239	2,640
2,9	0,439	0,812	1,800	1,800	2,405
3,2	0,226	0,543	1,486	1,479	2,091
3,5	0,160	0,332	1,054	1,126	1,908
3,8	0,095	0,208	0,838	0,679	1,363
4,1	0,056	0,126	0,418	0,400	0,883
4,4	0,039	0,073	0,244	0,216	0,491
4,7	0,037	0,046	0,192	0,116	0,328
5,0	0,032	0,039	0,096	0,067	0,183

**Tabelle 44 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 5 (981) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 5				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,332	2,126	2,580	2,888	3,349
2,0	1,055	1,758	2,504	2,812	3,017
2,3	0,869	1,560	2,323	2,443	2,860
2,6	0,705	1,222	2,209	2,175	2,666
2,9	0,602	0,956	1,834	2,015	2,562
3,2	0,374	0,707	1,603	1,397	2,293
3,5	0,218	0,432	1,229	1,198	1,714
3,8	0,107	0,194	0,812	0,703	1,316
4,1	0,068	0,100	0,611	0,377	0,895
4,4	0,044	0,062	0,329	0,206	0,569
4,7	0,023	0,051	0,190	0,119	0,293
5,0	0,021	0,032	0,107	0,066	0,175

**Tabelle 45 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 6 (955) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.c. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.c. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 6				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	1,047	1,720	2,319	1,659	2,513
2,0	0,845	1,064	1,931	1,684	2,362
2,3	0,958	0,773	1,357	1,081	2,134
2,6	0,627	0,721	1,101	0,855	1,992
2,9	0,432	0,692	0,760	0,628	1,042
3,2	0,348	0,315	0,410	0,418	1,043
3,5	0,290	0,281	0,349	0,191	0,659
3,8	0,101	0,099	0,163	0,115	0,430
4,1	0,087	0,066	0,099	0,060	0,282
4,4	0,037	0,046	0,077	0,036	0,118
4,7	0,038	0,028	0,032	0,028	0,080
5,0	0,026	0,021	0,026	0,025	0,045

**Tabelle 46 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 6 (955) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.jej. beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.jej. beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 6				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,890	1,565	2,096	2,179	2,977
2,0	0,764	1,051	1,785	1,557	2,657
2,3	0,494	1,078	1,293	1,307	2,284
2,6	0,582	0,657	1,071	0,835	2,237
2,9	0,479	0,479	0,823	0,718	1,710
3,2	0,289	0,491	0,565	0,493	1,192
3,5	0,264	0,266	0,344	0,283	1,115
3,8	0,137	0,144	0,226	0,120	0,845
4,1	0,073	0,086	0,132	0,077	0,412
4,4	0,040	0,052	0,032	0,058	0,267
4,7	0,022	0,025	0,029	0,027	0,139
5,0	0,018	0,020	0,022	0,022	0,070

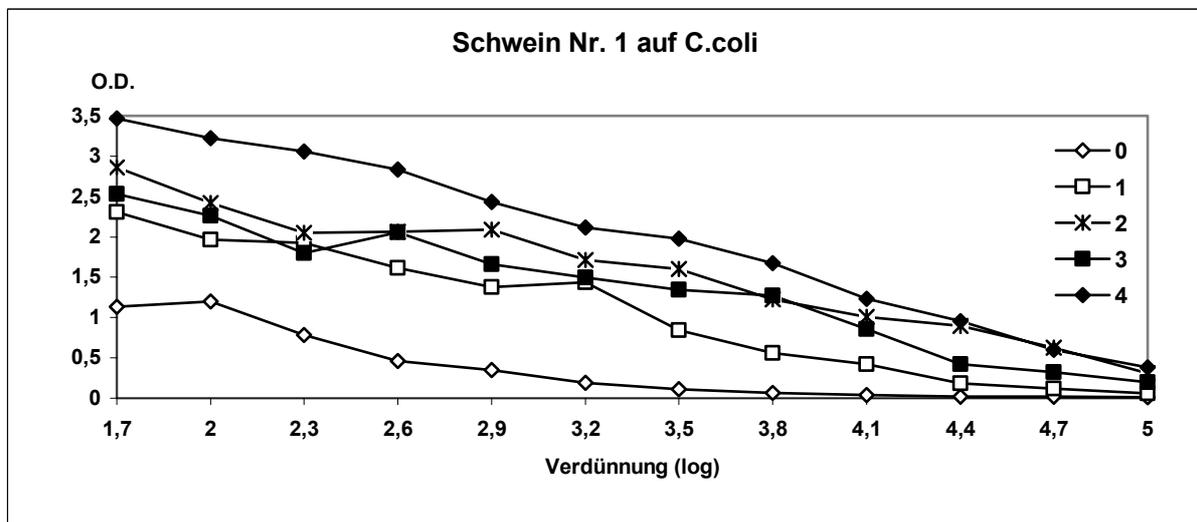
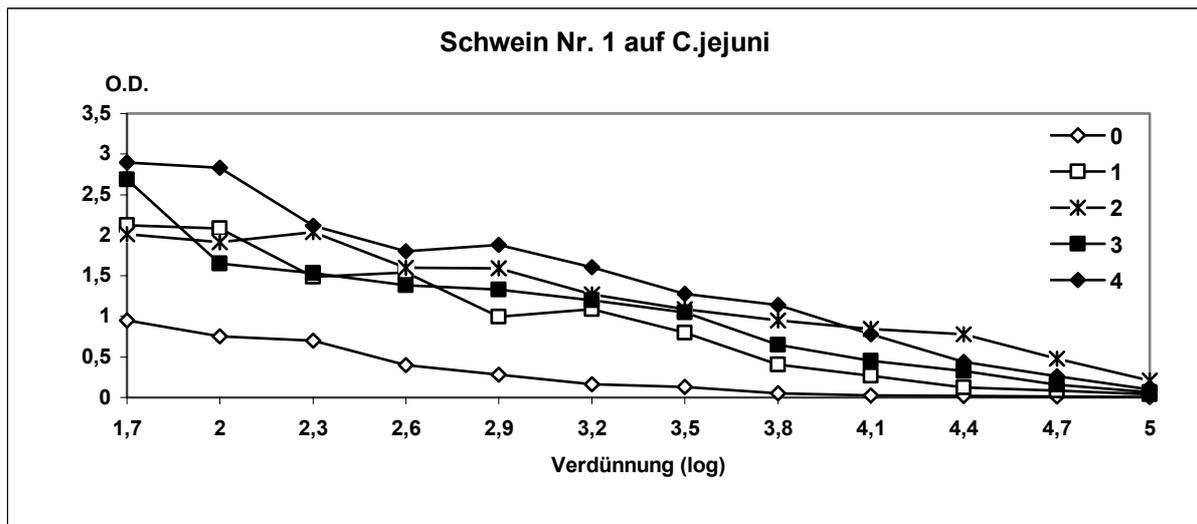
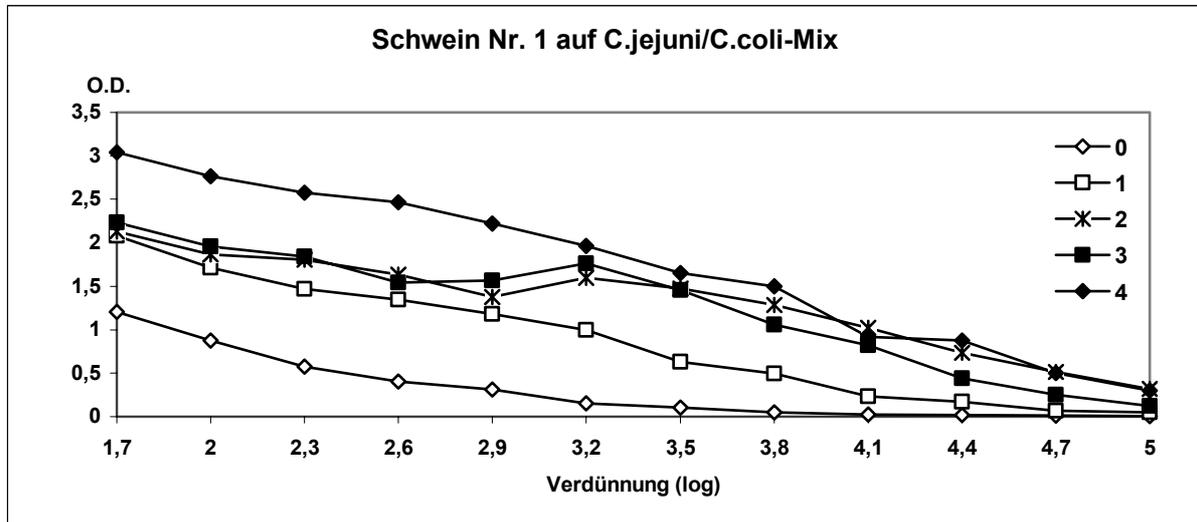
**Tabelle 47 OD-Werte der titrierten Seren von Impfschwein 6 (955) vor der Immunisierung (0), nach der ersten (Tag 29), nach der zweiten (Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (Tag 98) und nach der dritten (Tag 112) Immunisierung auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

Verdünnung in $\log_{10}$	OD-Werte der mit C.Mix beschichteten Platten				
	Serumproben von Impfschwein 6				
	0 (Tag 0)	1 (Tag 29)	2 (Tag 63)	3 (Tag 98)	4 (Tag 112)
1,7	0,739	1,329	1,555	1,328	2,233
2,0	0,598	0,876	1,541	1,173	2,111
2,3	0,530	0,987	1,434	0,903	2,073
2,6	0,524	0,598	1,332	0,713	2,040
2,9	0,348	0,599	0,888	0,557	1,356
3,2	0,241	0,440	0,487	0,377	1,002
3,5	0,192	0,237	0,359	0,177	0,788
3,8	0,114	0,133	0,240	0,091	0,475
4,1	0,072	0,072	0,136	0,068	0,372
4,4	0,037	0,040	0,067	0,044	0,151
4,7	0,025	0,025	0,038	0,022	0,095
5,0	0,017	0,022	0,022	0,020	0,050

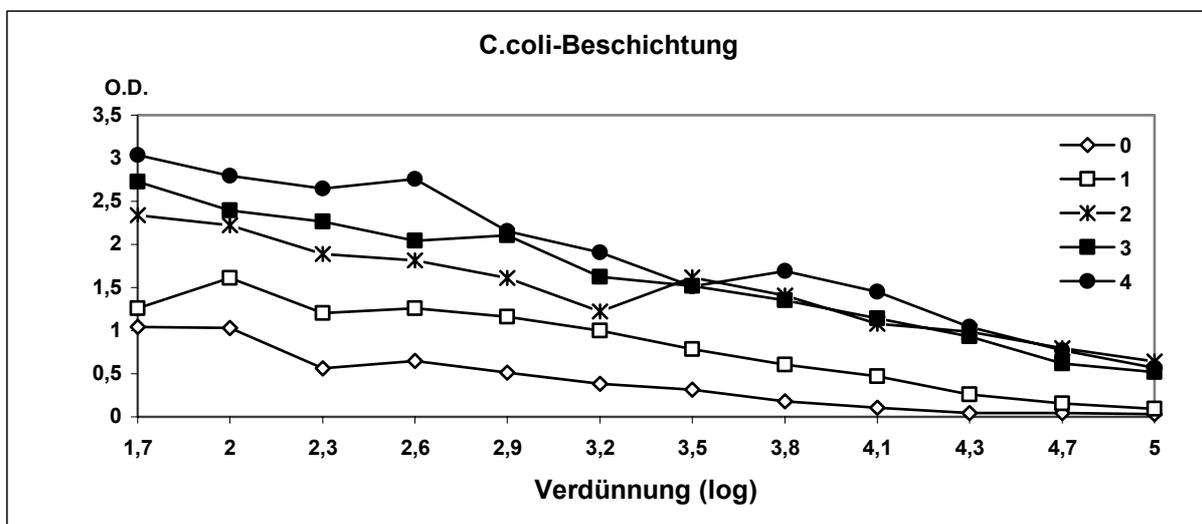
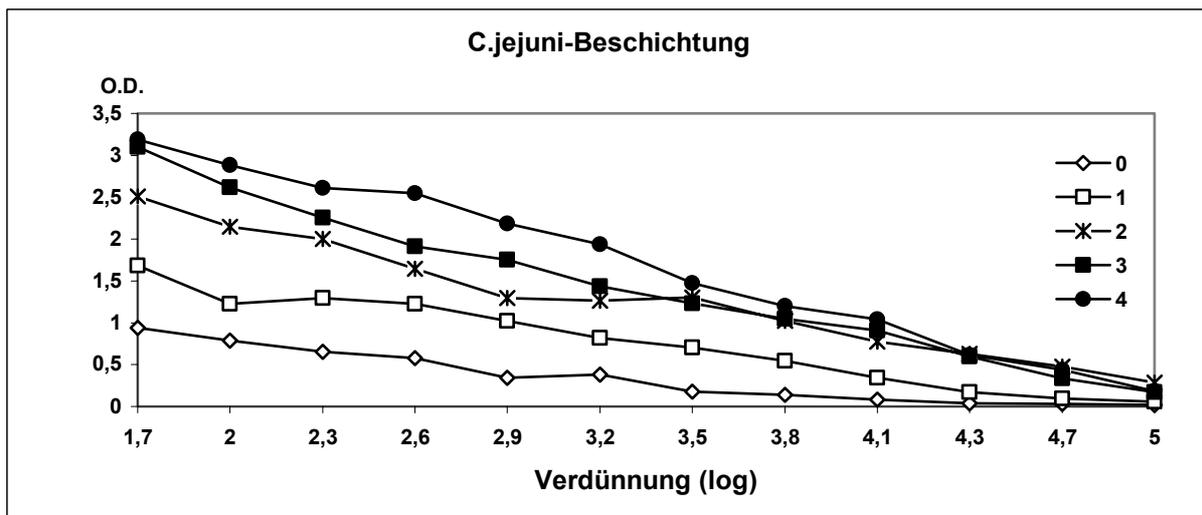
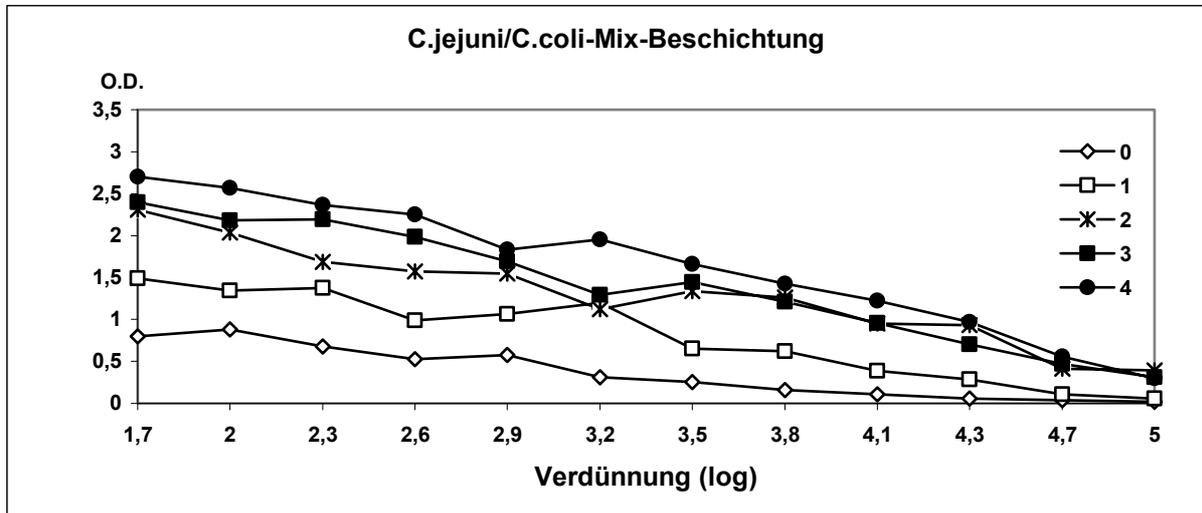
## VIII.2 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse von Serumproben der Impfschweine zu unterschiedlichen Immunisierungszeitpunkten

In den **Abbildungen 17 bis 22** sind Titrations von Seren der Impfschweine (vor der Immunisierung (0=Tag 0) , nach der ersten (1=Tag 29), nach der zweiten (2=Tag 63), zwei Monate nach der zweiten (3=Tag 98) und nach der dritten (4=Tag 112) Immunisierung auf verschiedenen Beschichtungen dargestellt (C.c., C.jej., Mix).

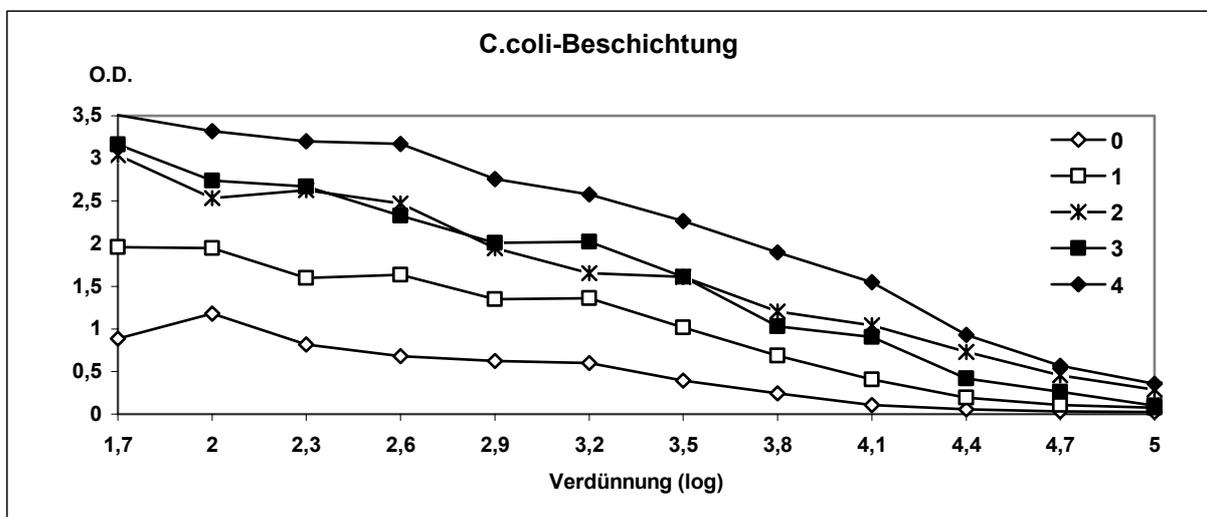
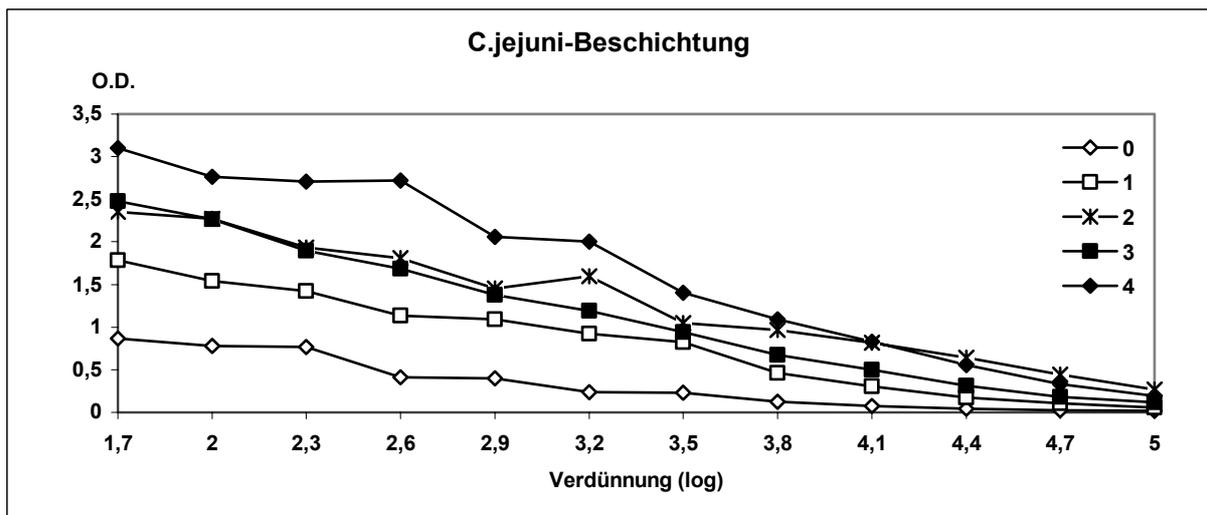
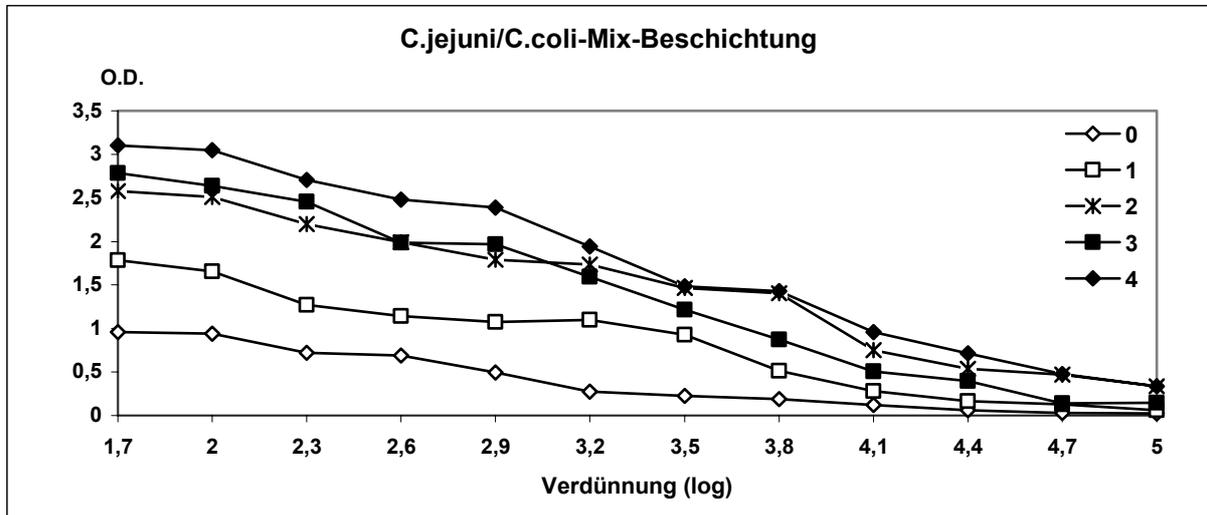
**Abbildung 17 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 1 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



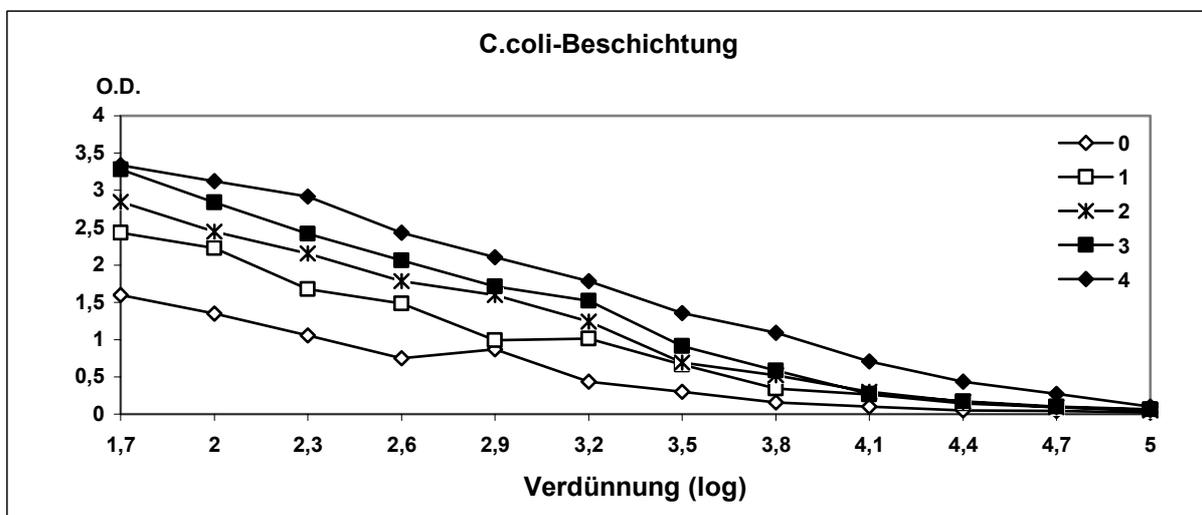
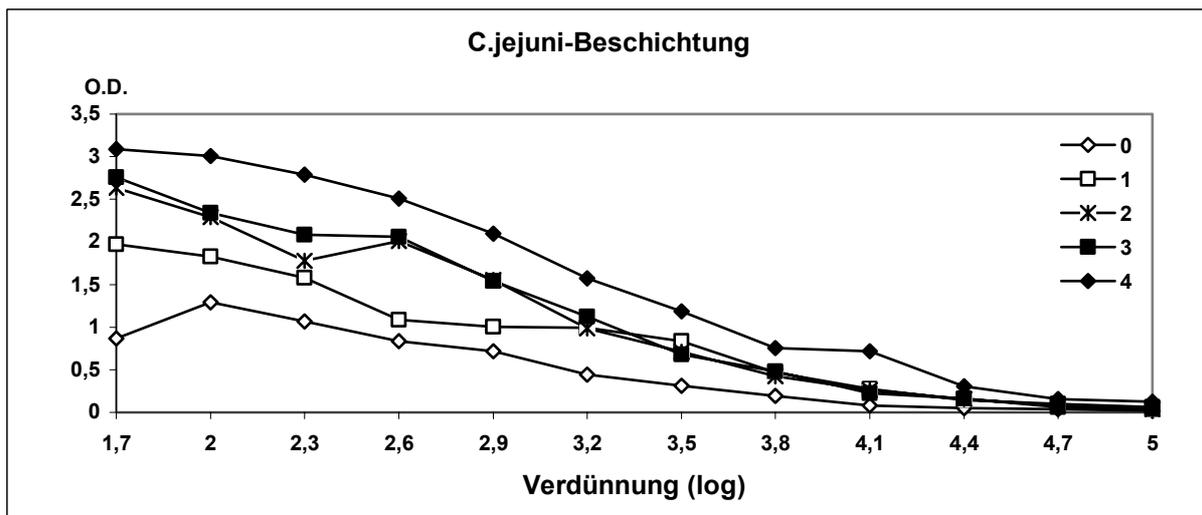
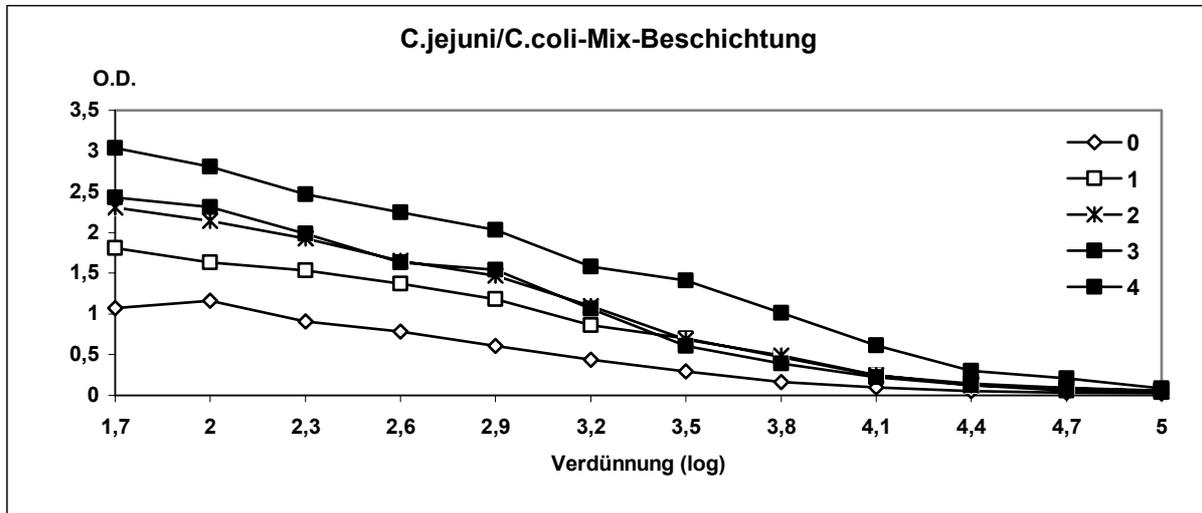
**Abbildung 18 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 2 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



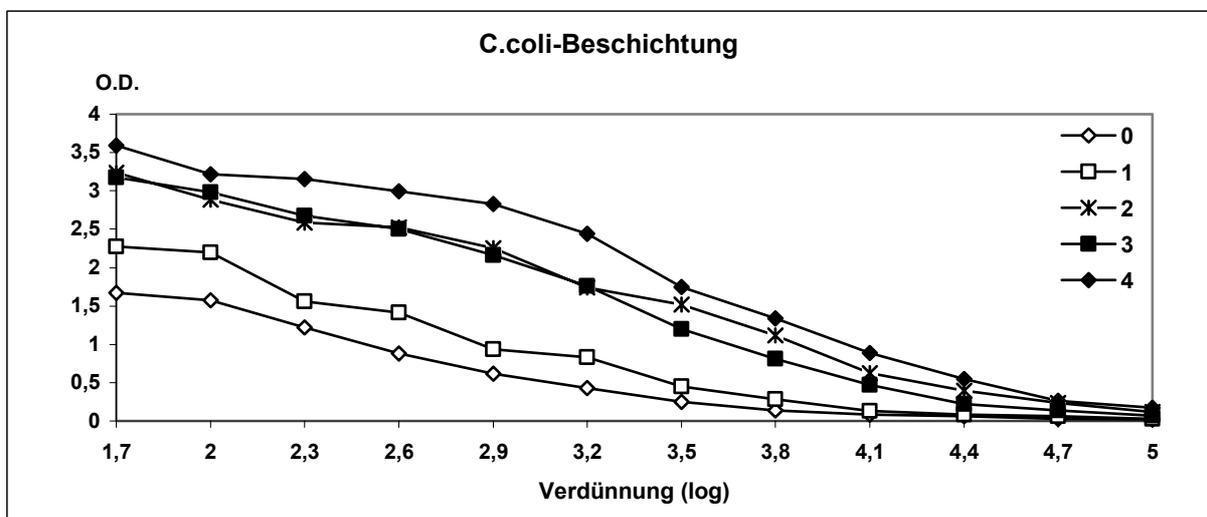
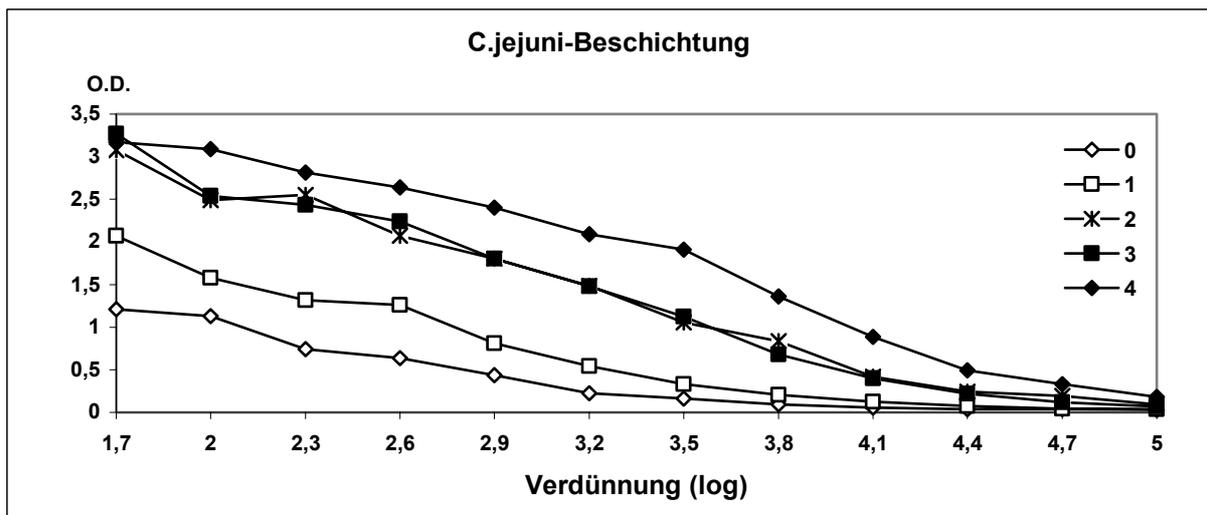
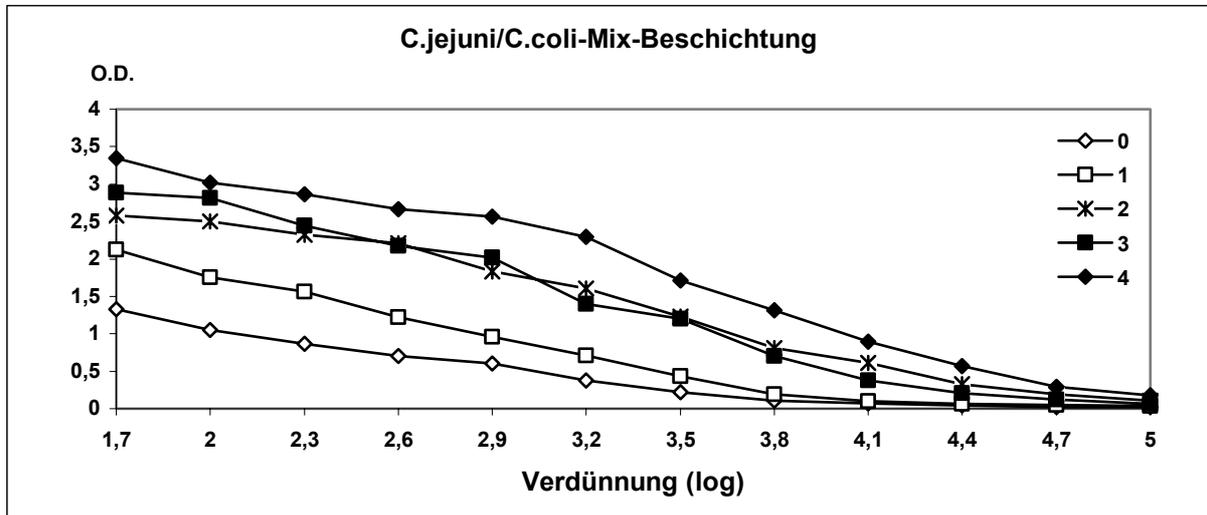
**Abbildung 19 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 3 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



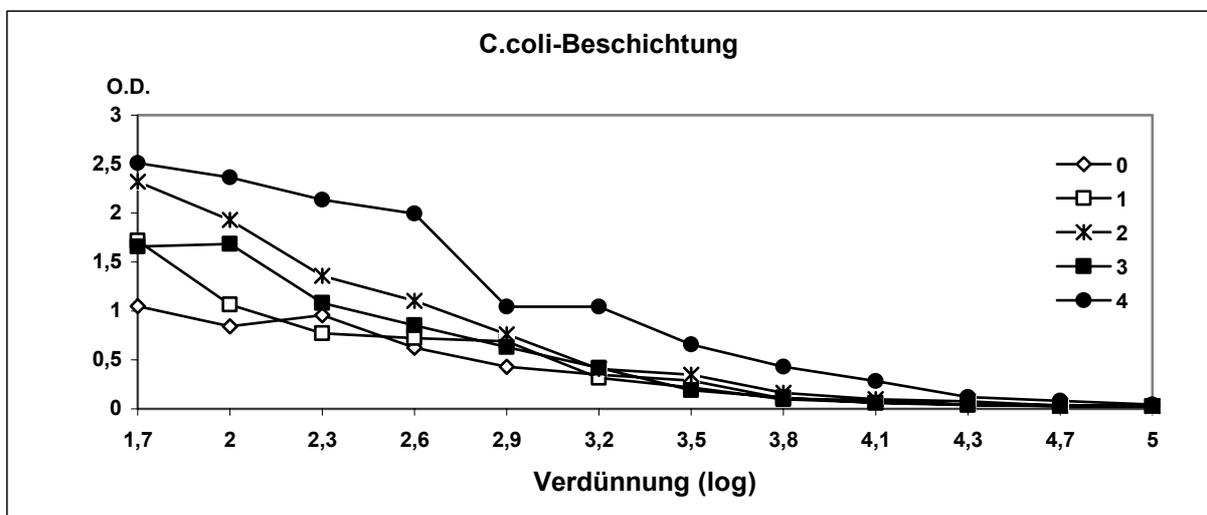
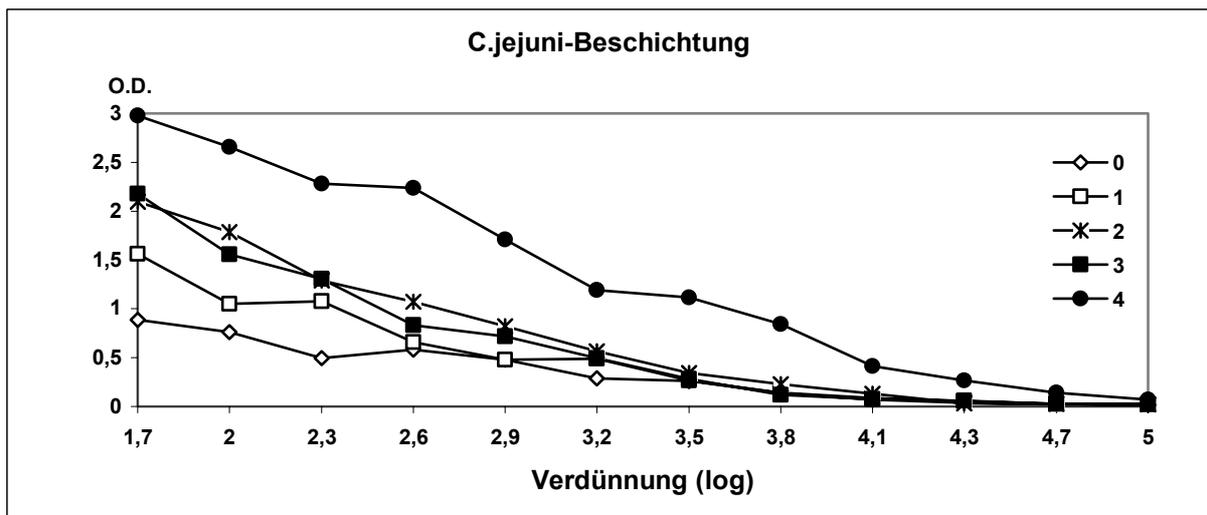
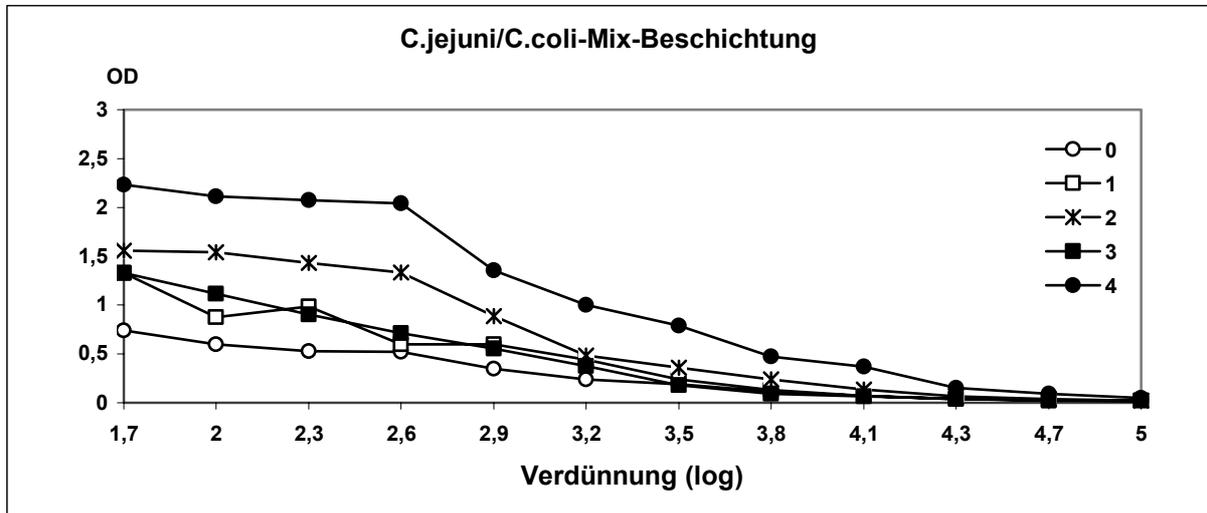
**Abbildung 20 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 4 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



**Abbildung 21 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 5 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



**Abbildung 22 Grafische Darstellung der Titrationsergebnisse der Seren von Schwein 6 auf verschiedenen Beschichtungen (0= vor der Immunisierung, 1=nach der ersten, 2=nach der zweiten, 3= zwei Monate nach der zweiten, 4= nach der dritten Immunisierung)**



### VIII.3 Untersuchungsergebnisse der Fleischsaftproben der sechs zur Antikörpergewinnung vakzinieren Impfschweine

Die **Tabellen 48 bis 53** zeigen eine vergleichende Darstellung der OD-Werte von  $\log_{10}$  1,7 bis 5,0 verdünnten Fleischsaftproben der Impfschweine auf mit C.c., C.jej. und Mix (C.c./C.jej.) beschichteten Platten.

**Tabelle 48 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 1 (931) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	2,320	1,797	1,824
2,0	2,136	1,614	1,752
2,3	1,831	1,188	1,490
2,6	1,613	0,771	1,233
2,9	1,511	0,519	0,949
3,2	1,106	0,289	0,699
3,5	0,742	0,122	0,569
3,8	0,442	0,081	0,372
4,1	0,201	0,045	0,174
4,4	0,116	0,031	0,090
4,7	0,059	0,020	0,066
5,0	0,034	0,014	0,036

**Tabelle 49 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 2 (916) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	2,377	2,400	2,076
2,0	2,098	1,871	2,132
2,3	2,022	1,730	1,801
2,6	1,733	1,313	1,741
2,9	1,475	0,941	1,319
3,2	1,336	0,589	1,199
3,5	0,849	0,366	0,889
3,8	0,618	0,204	0,749
4,1	0,410	0,115	0,406
4,4	0,261	0,060	0,226
4,7	0,155	0,049	0,111
5,0	0,079	0,025	0,067

**Tabelle 50 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 3 (1000) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	2,873	2,358	2,525
2,0	2,542	2,065	2,351
2,3	2,315	1,616	2,008
2,6	1,894	1,319	1,649
2,9	1,662	1,017	1,473
3,2	1,226	0,659	1,100
3,5	0,817	0,394	0,661
3,8	0,446	0,408	0,488
4,1	0,303	0,108	0,254
4,4	0,165	0,068	0,145
4,7	0,092	0,038	0,074
5,0	0,051	0,025	0,044

**Tabelle 51 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 4 (921) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	2,068	2,244	1,870
2,0	1,787	1,969	1,697
2,3	1,334	1,437	1,257
2,6	0,869	1,030	0,893
2,9	0,563	0,746	0,650
3,2	0,371	0,415	0,378
3,5	0,226	0,230	0,190
3,8	0,099	0,140	0,110
4,1	0,060	0,066	0,073
4,4	0,045	0,037	0,035
4,7	0,028	0,028	0,028
5,0	0,024	0,022	0,023

**Tabelle 52 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 5 (981) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	2,507	2,731	2,304
2,0	2,144	2,381	2,014
2,3	1,802	1,914	1,641
2,6	1,313	1,514	1,227
2,9	0,893	1,048	0,834
3,2	0,551	0,644	0,565
3,5	0,277	0,359	0,281
3,8	0,147	0,188	0,191
4,1	0,085	0,103	0,100
4,4	0,059	0,061	0,065
4,7	0,033	0,031	0,038
5,0	0,028	0,023	0,041

**Tabelle 53 Darstellung der Fleischsaft-OD-Werte von dem immunisierten Schwein 6 (955) auf verschiedenen Beschichtungen**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Platten-Beschichtung mit:		
	C.c.	C.jej.	Mix (C.c./C.jej.)
1,7	1,774	1,969	1,518
2,0	1,440	1,517	1,549
2,3	1,121	1,194	1,016
2,6	0,822	0,776	0,734
2,9	0,435	0,525	0,562
3,2	0,233	0,292	0,268
3,5	0,125	0,141	0,151
3,8	0,081	0,076	0,085
4,1	0,054	0,054	0,042
4,4	0,053	0,046	0,030
4,7	0,046	0,024	0,018
5,0	0,051	0,018	0,014

#### VIII.4 Ergebnisse der Präadsorption der Hyperimmunseren mit homologem und E.coli Antigen

In den Tabellen 54 bis 59 sind die OD-Werte von  $\log_{10}$  1,7 bis 5,0 verdünnten C.c.- und C.jej.-Hyperimmunseren nach Präadsorption mit dem jeweils homologen Antigen bzw. A. dest. auf einer C.c., C.jej. und einer Mix (C.c./C.jej.) Beschichtung dargestellt.

**Tabelle 54 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer C.c.- Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit C.c.	
	C.c.- Serum + C.c.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	2,109	3,595
2,0	1,343	3,553
2,3	0,786	3,367
2,6	0,618	3,382
2,9	0,429	2,851
3,2	0,135	2,980
3,5	0,114	2,585
3,8	0,043	2,170
4,1	0,039	1,788
4,4	0,026	1,600
4,7	0,021	0,957
5,0	0,018	0,495

**Tabelle 55 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer C.c.- Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit C.c.	
	C.jej.-Serum + C. jej.-Antige	C.jej.- Serum + A. dest.
1,7	1,737	3,572
2,0	1,046	3,444
2,3	0,553	3,224
2,6	0,412	2,989
2,9	0,263	2,534
3,2	0,123	2,109
3,5	0,101	1,591
3,8	0,059	0,775
4,1	0,051	0,658
4,4	0,054	0,383
4,7	0,033	0,197
5,0	0,029	0,116

**Tabelle 56 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer C.jej.- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit C.jej.	
	C.c.- Serum + C.c.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	1,695	3,162
2,0	1,258	3,181
2,3	0,733	2,736
2,6	0,388	2,538
2,9	0,227	2,013
3,2	0,141	1,697
3,5	0,086	1,457
3,8	0,051	1,171
4,1	0,030	0,687
4,4	0,019	0,455
4,7	0,015	0,245
5,0	0,016	0,117

**Tabelle 57 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer C.jej.- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit C.jej.	
	C.jej.-Serum + C. jej.-Antige	C.jej.- Serum + A. dest.
1,7	1,161	3,247
2,0	0,774	3,147
2,3	0,393	2,883
2,6	0,271	2,566
2,9	0,139	2,143
3,2	0,098	1,980
3,5	0,066	1,259
3,8	0,056	0,864
4,1	0,029	0,548
4,4	0,023	0,280
4,7	0,021	0,160
5,0	0,015	0,086

**Tabelle 58 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer Mix (C.c./C.jej.)-Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit Mix (C.c./C.jej.)	
	C.c.- Serum + C.c.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	2,567	3,525
2,0	1,767	3,544
2,3	1,274	3,409
2,6	1,033	3,375
2,9	0,632	3,123
3,2	0,319	3,053
3,5	0,210	2,713
3,8	0,122	2,301
4,1	0,062	1,698
4,4	0,043	1,279
4,7	0,022	0,751
5,0	0,019	0,300

**Tabelle 59 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit homologem Antigen / A. dest. auf einer Mix (C.c./C.jej.)-Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit Mix (C.c./C.jej.)	
	C.jej.-Serum + C. jej.-Antige	C.jej.- Serum + A. dest.
1,7	1,653	3,646
2,0	1,389	3,645
2,3	1,008	3,390
2,6	0,649	3,394
2,9	0,543	2,900
3,2	0,297	2,629
3,5	0,185	1,778
3,8	0,099	1,318
4,1	0,059	0,777
4,4	0,038	0,515
4,7	0,026	0,579
5,0	0,021	0,139

In den **Tabellen 60 bis 65** sind die OD-Werte von  $\log_{10}$  1,7 bis 5,0 verdünnten C.c.- und C.jej.-Hyperimmunseren nach Präadsorption mit Escherichia coli Antigen bzw. A. dest. auf einer C.c., C.jej. und einer Mix (C.c./C.jej.) Beschichtung dargestellt.

**Tabelle 60 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer C.c.- Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit C.c.	
	C.c.- Serum + E.coli.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	2,850	3,011
2,0	2,976	3,084
2,3	2,816	3,008
2,6	2,958	2,814
2,9	2,288	2,455
3,2	2,226	2,493
3,5	1,784	2,034
3,8	1,125	1,420
4,1	1,178	0,894
4,4	0,700	0,712
4,7	0,447	0,504
5,0	0,182	0,158

**Tabelle 61 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer C.c.- Beschichtung**

Verdünnung $\log_{10}$	OD-Werte einer Beschichtung mit C.c.	
	C.jej.-Serum + E.coli.-Antigen	C.jej.Serum + A. dest.
1,7	1,924	2,280
2,0	1,991	2,253
2,3	1,729	2,188
2,6	1,284	1,918
2,9	1,040	1,126
3,2	0,798	1,011
3,5	0,499	0,591
3,8	0,238	0,305
4,1	0,110	0,199
4,4	0,074	0,111
4,7	0,045	0,059
5,0	0,023	0,034

**Tabelle 62 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer C.jej.- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit C.jej.	
	C.c.- Serum + E.coli.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	2,192	2,296
2,0	2,357	2,417
2,3	1,942	2,493
2,6	2,033	2,094
2,9	1,889	1,958
3,2	1,569	1,895
3,5	1,040	1,391
3,8	0,913	1,116
4,1	0,663	0,800
4,4	0,367	0,454
4,7	0,228	0,267
5,0	0,126	0,147

**Tabelle 63 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer C.jej.- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit C.jej.	
	C.jej.-Serum + E.coli.-Antigen	C.jej.Serum + A. dest.
1,7	1,889	1,637
2,0	1,636	2,031
2,3	1,593	1,856
2,6	1,263	1,783
2,9	1,012	1,101
3,2	0,795	0,870
3,5	0,590	0,791
3,8	0,380	0,470
4,1	0,172	0,282
4,4	0,090	0,093
4,7	0,056	0,067
5,0	0,027	0,042

**Tabelle 64 OD-Werte eines C.c.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer Mix (C.c./C.jej.)- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit Mix (C.c./C.jej.)	
	C.c.- Serum + E.coli.-Antigen	C.c.- Serum + A. dest.
1,7	3,347	3,322
2,0	3,117	3,015
2,3	2,909	3,146
2,6	2,564	2,708
2,9	2,371	2,420
3,2	2,216	2,216
3,5	1,520	1,632
3,8	1,434	1,360
4,1	0,887	1,147
4,4	0,659	0,768
4,7	0,318	0,494
5,0	0,183	0,227

**Tabelle 65 OD-Werte eines C.jej.-Antiserums nach Präadsorption mit E. coli Antigen / A. dest. auf einer Mix (C.c./C.jej.)- Beschichtung**

Verdünnung log <sub>10</sub>	OD-Werte einer Beschichtung mit Mix (C.c./C.jej.)	
	C.jej.-Serum + E.coli.-Antigen	C.jej.Serum + A. dest.
1,7	2,936	3,065
2,0	2,373	2,435
2,3	1,990	2,527
2,6	1,712	1,818
2,9	1,364	1,667
3,2	0,894	0,937
3,5	0,595	0,648
3,8	0,348	0,487
4,1	0,199	0,249
4,4	0,108	0,137
4,7	0,050	0,086
5,0	0,031	0,042

### VIII.5 Untersuchungsergebnisse von Feldproben aus unterschiedlichen Einsendungen

In den **Tabellen 66 bis 70** sind vergleichend OD-Werte von Feldserumproben aus unterschiedlichen Einsendungen (SE) in Serumverdünnungen von 1:100 und 1:400 auf C.c., C.jej. und Mix Beschichtungen dargestellt.

**Tabelle 66 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldserumproben aus Einsendung SE 9 auf je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD- Werte bei Serumverdünnung 1:100			OD- Werte bei Serumverdünnung 1:400		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,903	1,031	1,411	0,563	0,635	0,667
2	1,212	0,988	1,213	0,542	0,571	0,725
3	0,721	0,646	1,075	0,358	0,439	0,483
4	1,059	1,045	1,299	0,665	0,835	0,712
5	1,181	1,033	1,509	0,597	0,506	0,775
6	0,804	0,807	1,231	0,462	0,440	0,569
7	1,334	0,833	1,462	0,631	0,574	0,713
8	1,147	0,941	1,336	0,690	0,534	0,717
9	1,239	0,957	1,189	0,786	0,528	0,731
10	1,357	1,090	1,586	0,647	0,443	0,640
11	1,375	0,982	1,813	0,583	0,596	0,858
12	0,960	0,858	1,207	1,048	0,548	0,678
13	1,155	0,795	0,931	0,892	0,452	0,671
14	1,207	0,670	1,243	1,019	0,677	0,687
15	0,890	0,545	1,034	0,562	0,371	0,509
16	0,772	0,517	0,806	0,402	0,351	0,484
17	1,048	0,870	1,169	0,386	0,372	0,506
18	0,797	0,602	1,079	0,397	0,388	0,517
19	1,239	0,900	1,324	0,640	0,649	0,706
20	0,733	0,669	0,965	0,535	0,290	0,490

**Tabelle 67 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldserumproben aus Einsendung SE 8 auf je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1:100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1:400		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,997	0,537	0,898	0,560	0,298	0,673
2	1,236	0,889	1,668	1,139	0,997	1,332
3	1,248	0,981	1,318	0,966	1,044	1,096
4	1,161	0,585	1,098	0,632	0,578	1,160
5	1,520	0,995	1,568	1,030	0,808	1,101
6	1,081	0,727	0,974	0,623	0,634	0,845
7	1,201	0,609	0,868	0,877	0,788	0,826
8	1,054	0,398	1,188	0,912	0,512	0,895
9	0,845	0,741	1,130	0,542	0,449	0,775
10	0,783	0,581	1,267	0,615	0,366	0,894
11	0,996	0,785	1,150	0,633	0,562	0,930
12	0,713	0,575	0,590	0,406	0,435	0,655
13	0,972	0,552	1,037	0,718	0,321	0,788
14	1,002	0,901	0,910	0,684	0,663	0,759
15	0,894	0,583	0,812	0,659	0,512	0,349
16	0,806	0,465	1,143	0,686	0,622	0,816
17	1,110	0,840	1,096	0,495	0,387	0,781
18	0,903	0,486	0,749	0,614	0,367	0,755
19	1,108	0,911	1,030	0,855	0,523	0,885
20	0,964	0,751	1,100	0,750	0,506	0,775
21	0,898	0,673	1,059	1,072	0,532	0,949
22	0,825	0,645	0,948	0,634	0,519	0,666
23	0,977	0,683	1,186	0,692	0,584	0,990
24	0,699	0,693	1,153	0,596	0,541	0,743
25	0,939	0,850	1,142	0,968	0,744	0,923
26	1,209	1,070	1,226	0,884	0,574	1,011
27	0,840	0,794	0,843	0,697	0,527	0,890
28	0,862	0,791	1,327	0,539	0,389	0,648
29	1,331	1,006	1,722	0,804	0,746	1,083

**Tabelle 68 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldserumproben aus Einsendung SE 10 je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1:100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1:400		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,594	0,419	0,674	0,309	0,194	0,314
2	0,558	0,493	0,858	0,402	0,260	0,529
3	0,559	0,619	0,800	0,400	0,361	0,501
4	0,663	0,343	0,700	0,273	0,166	0,286
5	0,668	0,785	1,076	0,435	0,484	0,622
6	0,666	0,559	0,729	0,492	0,252	0,459
7	0,497	0,516	1,021	0,365	0,266	0,451
8	0,959	0,952	1,200	0,521	0,417	0,658
9	0,576	0,395	0,728	0,331	0,232	0,476
10	0,424	0,274	0,467	0,226	0,110	0,248
11	0,713	0,356	0,573	0,269	0,199	0,300
12	0,756	0,383	0,591	0,437	0,259	0,395
13	0,782	0,661	0,962	0,495	0,345	0,543
14	1,177	0,724	1,122	0,544	0,193	0,544
15	1,132	0,902	1,142	0,789	0,503	0,893
16	1,113	0,895	1,159	0,755	0,418	0,674
17	1,224	0,902	1,339	1,006	0,617	1,063
18	0,985	0,607	0,899	0,683	0,336	0,686
19	0,919	0,636	1,342	0,795	0,366	0,713
20	1,014	0,758	0,861	0,576	0,358	0,551
21	1,031	1,231	1,455	0,881	0,886	1,006
22	1,342	1,002	1,462	0,875	0,554	0,849
23	0,737	0,849	1,293	0,463	0,543	0,566
24	1,103	0,875	1,442	0,819	0,460	0,865

**Tabelle 69 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldserumproben aus Einsendung SE 11 je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1:100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1:400		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,836	0,741	0,999	0,526	0,341	0,653
2	1,240	0,849	1,449	0,602	0,376	0,969
3	0,777	0,653	1,073	0,428	0,289	0,625
4	1,009	0,757	0,977	0,466	0,379	0,458
5	0,878	0,606	1,077	0,488	0,271	0,538
6	0,777	0,710	0,949	0,523	0,231	0,607
7	0,825	0,645	1,165	0,492	0,373	0,634
8	1,026	0,969	1,537	0,660	0,430	0,720
9	0,949	0,795	1,101	0,441	0,463	0,768
10	1,075	1,082	1,606	0,512	0,489	0,907
11	0,785	0,782	1,094	0,414	0,327	0,681
12	0,965	0,613	1,023	0,552	0,358	0,663
13	1,216	1,000	1,317	0,750	0,532	0,681
14	0,891	0,758	1,334	0,382	0,338	0,604
15	0,669	0,432	0,826	0,280	0,236	0,385

**Tabelle 70 Vergleich der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldserumproben aus Einsendung SE 12 je einer mit C.c.-, C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung 1:100			OD-Werte bei Serumverdünnung 1:400		
	Plattenschichtung mit			Plattenschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,690	0,653	1,074	0,527	0,396	0,532
2	1,063	0,797	1,304	0,775	0,739	0,747
3	1,041	0,838	1,115	0,602	0,448	0,554
4	1,176	0,885	1,455	0,578	0,282	0,644
5	0,998	0,781	1,262	0,579	0,413	0,623
6	0,857	0,820	1,223	0,672	0,493	0,643
7	1,105	0,823	1,167	0,514	0,355	0,509
8	0,983	0,829	1,272	0,450	0,392	0,555
9	1,064	0,738	1,245	0,374	0,254	0,506
10	0,855	0,789	1,078	0,586	0,513	0,642
11	0,943	0,762	1,020	1,264	0,388	0,540
12	1,164	0,925	1,269	0,641	0,513	0,723
13	1,277	1,105	1,465	0,656	0,724	0,904
14	1,291	0,808	1,369	0,472	0,510	0,716
15	0,938	0,675	1,055	0,424	0,390	0,438

In den **Tabellen 71 bis 75** sind vergleichend OD-Werte von Feldserumproben aus unterschiedlichen Einsendungen (SE) in Serumverdünnungen von 1:100 und 1:400 auf Mix (C.c./C.jej.) Beschichtungen dargestellt.

**Tabelle 71 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben aus Einsendung SE 13 auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
	OD-Werte bei Serumverdünnung	
Proben Nr.	1:100	1:400
1	0,192	0,126
2	0,581	0,289
3	0,409	0,168
4	0,130	0,042
5	0,292	0,124
6	0,824	0,415
7	0,489	0,161
8	1,010	0,293
9	0,893	0,527
10	0,941	0,389

**Tabelle 72 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben aus Einsendung SE 14 auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte**

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
	OD-Werte bei Serumverdünnung	
Proben Nr.	1:100	1:400
1	0,894	0,377
2	1,405	0,573
3	0,910	0,492
4	0,904	0,295
5	1,389	0,563
6	0,782	0,450
7	0,893	0,750
8	1,167	0,673
9	1,400	0,585
10	1,332	0,394
11	0,903	0,257
12	0,936	0,588
13	0,791	0,409
14	1,028	0,367
15	1,046	0,597

**Tabelle 73** Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben aus Einsendung SE 15 auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung	
	1:100	1:400
1	1,090	0,819
2	0,947	0,819
3	0,956	0,445
4	1,060	0,679
5	1,189	0,616
6	0,826	0,497
7	1,081	0,787
8	1,264	0,838
9	1,105	0,980
10	1,141	0,688
11	1,347	0,757
12	1,023	0,647
13	0,987	0,791
14	0,858	0,679
15	0,858	0,526
16	0,747	0,565
17	1,179	0,624
18	0,620	0,397
19	1,044	0,529
20	0,798	0,510

**Tabelle 74** Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben aus Einsendung SE 16 auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
	OD-Werte bei Serumverdünnung	
Proben Nr.	1:100	1:400
1	1,098	0,513
2	1,494	0,583
3	0,908	0,378
4	0,822	0,495
5	0,826	0,389
6	0,955	0,641
7	0,981	0,494
8	1,363	0,669
9	1,068	0,498
10	1,273	0,540
11	0,851	0,592
12	0,861	0,703
13	1,295	0,430
14	1,046	0,498
15	0,739	0,384

**Tabelle 75** Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Serumproben aus Einsendung SE 17 auf einer mit C.-Mix beschichteten Platte

<b>Antigenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>		
	OD-Werte bei Serumverdünnung	
Proben Nr.	1:100	1:400
1	0,837	0,500
2	1,410	0,449
3	1,449	0,685
4	1,382	0,465
5	0,921	0,575
6	0,855	0,677
7	0,922	0,446
8	0,985	0,603
9	1,105	0,446
10	1,132	0,371
11	0,938	0,564
12	0,988	0,618
13	1,162	0,569
14	1,063	0,465
15	0,789	0,347

In den **Tabellen 76 bis 80** sind vergleichend OD-Werte von Feldserumproben aus unterschiedlichen Einsendungen (SE) in Serumverdünnungen von 1:100 und 1:400 auf Mix (C.c./C.jej.) Beschichtungen mit den Ergebnissen der Salmonellen-Antikörper Bestimmung dargestellt.

**Tabelle 76 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren (SE 18) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)			
	OD-Werte bei Serumverdünnung		Salmotype®-ELISA
Proben Nr.	1:100	1:400	Ergebnis
1	1,320	0,847	neg
2	1,245	1,158	neg
3	1,023	0,796	neg
4	0,839	0,534	neg
5	1,082	0,952	neg
6	0,979	0,874	neg
7	0,871	0,702	neg
8	0,979	0,857	pos
9	1,332	0,742	neg
10	0,851	0,627	neg
11	0,791	0,547	neg
12	0,973	0,932	neg
13	0,892	0,792	neg
14	0,775	0,732	neg

**Tabelle 77 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren (SE 19) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)			Salmotype®-ELISA
	OD-Werte bei Serumverdünnung		
Proben Nr.	1:100	1:400	Ergebnis
1	1,107	0,794	neg
2	1,271	0,957	pos
3	1,677	0,820	neg
4	1,533	0,955	neg
5	1,300	0,735	neg
6	1,254	0,695	neg
7	1,338	0,637	neg
8	1,092	0,671	neg
9	1,487	0,872	neg
10	1,555	0,952	neg
11	1,182	0,649	neg
12	1,638	0,881	neg
13	1,649	1,028	neg
14	1,061	0,665	neg
15	1,483	0,638	neg
16	1,294	0,816	neg
17	1,371	0,812	neg
18	1,571	1,050	neg
19	1,091	0,574	neg
20	1,182	0,636	neg
21	1,268	0,675	neg
22	1,203	0,775	neg
23	1,330	0,762	neg
24	1,199	0,704	neg
25	1,350	0,877	neg
26	0,922	0,584	neg
27	1,164	0,564	neg
28	1,381	0,749	neg
29	1,151	0,672	neg
30	1,788	1,210	neg

**Tabelle 78 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren (SE 20) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)			Salmotype®-ELISA
	OD-Werte bei Serumverdünnung		
Proben Nr.	1:100	1:400	Ergebnis
1	0,630	0,481	neg
2	0,716	0,374	neg
3	1,161	0,731	neg
4	0,927	0,649	neg
5	1,151	0,414	neg
6	1,233	0,553	neg
7	1,106	0,644	neg
8	1,224	0,675	neg
9	0,700	0,463	neg
10	0,961	0,755	neg
11	0,764	0,521	neg
12	0,702	0,426	neg
13	0,971	0,432	neg
14	1,472	0,729	neg
15	1,118	0,633	neg
16	1,119	0,684	neg
17	1,360	0,692	neg
18	1,197	0,882	neg
19	1,216	0,474	neg
20	0,809	0,608	neg

**Tabelle 79 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren (SE 21) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)			Salmotype®-ELISA
	OD-Werte bei Serumverdünnung		
Proben Nr.	1:100	1:400	Ergebnis
1	0,977	0,451	neg
2	0,963	0,474	neg
3	0,643	0,331	neg
4	1,113	0,496	neg
5	0,972	0,426	neg
6	0,938	0,431	neg
7	0,844	0,373	pos
8	1,055	0,509	neg
9	1,309	0,644	neg
10	1,289	0,821	neg
11	0,907	0,429	neg
12	1,491	0,697	neg
13	1,229	0,494	neg
14	1,088	0,581	neg
15	0,834	0,435	neg
16	0,809	0,457	neg
17	1,011	0,423	neg
18	1,105	0,821	neg
19	1,206	0,862	neg
20	1,115	0,535	neg
21	0,956	0,641	neg
22	0,846	0,502	neg
23	1,056	0,491	neg

**Tabelle 80 Darstellung der OD-Werte von 1:100 und 1:400 verdünnten Feldseren (SE 22) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)			Salmotype®- ELISA
Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung		
	1:100	1:400	Ergebnis
1	1,213	0,520	neg
2	1,841	1,056	neg
3	1,632	1,050	neg
4	1,117	0,710	neg
5	1,710	0,928	neg
6	1,370	0,687	neg
7	1,334	1,019	neg
8	1,600	0,672	neg
9	1,261	0,594	neg
10	1,102	0,659	pos
11	1,031	0,710	neg
12	0,768	0,564	neg
13	0,977	0,579	neg
14	1,262	0,538	neg
15	1,228	0,788	neg
16	1,005	0,615	neg
17	1,391	0,597	neg
18	0,877	0,527	neg
19	1,087	0,660	neg
20	1,125	0,896	neg
21	1,212	0,865	neg
22	0,934	0,523	neg
23	1,395	0,780	neg
24	1,047	0,576	neg
25	1,002	0,599	neg
26	1,240	0,748	neg
27	1,106	0,963	neg
28	1,146	0,549	neg
29	1,347	0,837	neg

In den **Tabellen 81 bis 83** sind vergleichend OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben aus unterschiedlichen Einsendungen (FS), vergleichend auf C.c., C.jej. und Mix Beschichtungen dargestellt.

**Tabelle 81 Vergleich der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben einer Einsendung (FS 16) auf je einer mit C.c.-C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:30			OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,996	0,789	0,910	0,531	0,413	0,491
2	0,821	0,634	0,730	0,391	0,256	0,287
3	0,958	0,808	0,907	0,513	0,260	0,449
4	0,422	0,329	0,409	0,166	0,134	0,149
5	0,722	0,508	0,741	0,337	0,299	0,355
6	1,063	0,807	0,939	0,621	0,331	0,722
7	0,829	0,583	0,747	0,368	0,188	0,396
8	0,673	0,564	0,649	0,286	0,201	0,290
9	0,606	0,424	0,484	0,285	0,145	0,265
10	0,908	0,557	0,731	0,377	0,290	0,360

**Tabelle 82 Vergleich der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben einer Einsendung (FS 17) auf je einer mit C.c.-C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:30			OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	1,029	0,799	0,753	0,433	0,313	0,478
2	0,963	0,612	0,868	0,572	0,325	0,477
3	0,656	0,689	0,806	0,409	0,228	0,374
4	0,914	0,678	1,000	0,523	0,412	0,509
5	0,832	0,529	0,803	0,492	0,353	0,405
6	1,033	0,561	1,031	0,571	0,336	0,466
7	0,743	0,467	0,790	0,439	0,226	0,406
8	1,039	0,755	1,109	0,777	0,374	0,608
9	0,963	0,560	0,852	0,449	0,268	0,405
10	0,704	0,472	0,805	0,439	0,241	0,386

**Tabelle 83 Vergleich der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben einer Einsendung (FS 18) auf je einer mit C.c.-C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:30			OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	Plattenbeschichtung mit			Plattenbeschichtung mit		
Proben Nr.	C.c.	C.jej.	Mix	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,780	0,581	1,032	0,644	0,435	0,525
2	1,016	0,640	0,954	0,596	0,335	0,534
3	0,684	0,508	0,879	0,296	0,170	0,229
4	1,008	0,685	1,166	0,614	0,346	0,406
5	1,050	0,657	0,902	0,577	0,314	0,463
6	1,119	0,469	0,875	0,620	0,264	0,452
7	1,305	0,898	1,244	0,759	0,339	0,618
8	1,150	0,658	0,994	0,781	0,405	0,660
9	1,441	1,037	1,375	1,170	0,605	0,856

In den **Tabellen 84 bis 86** sind die OD-Werte von 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben aus unterschiedlichen Einsendungen (FS) vergleichend auf C.c., C.jej. und Mix Beschichtungen dargestellt.

**Tabelle 84 Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Feldfleischsaft-Proben einer Einsendung (FS 19) auf je einer mit C.c.- C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

Proben Nr.	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	Plattenbeschichtung mit		
	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,254	0,193	0,280
2	0,134	0,124	0,110
3	0,227	0,208	0,200
4	0,230	0,250	0,285
5	0,095	0,101	0,127
6	0,086	0,106	0,121
7	0,124	0,053	0,116
8	0,456	0,294	0,533
9	0,246	0,202	0,223
10	0,304	0,250	0,276
11	0,123	0,121	0,141
12	0,154	0,134	0,125
13	0,062	0,082	0,087
14	0,141	0,097	0,185

**Tabelle 85 Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Feldfleischsaft-Proben einer Einsendung (FS 20) auf je einer mit C.c.- C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	<b>Plattenbeschichtung mit</b>		
Proben Nr.	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,366	0,233	0,341
2	0,409	0,336	0,422
3	0,249	0,305	0,212
4	0,288	0,295	0,297
5	0,221	0,195	0,159
6	0,481	0,540	0,635
7	0,080	0,103	0,138
8	0,140	0,116	0,169
9	0,105	0,057	0,089
10	0,319	0,198	0,328
11	0,203	0,143	0,197
12	0,351	0,229	0,337
13	0,261	0,192	0,220
14	0,281	0,208	0,338

**Tabelle 86 Darstellung der OD-Werte von 1:100 verdünnten Feldfleischsaft-Proben einer Einsendung (FS 21) auf je einer mit C.c.- C.jej.- und Mischantigen (Mix) beschichteten Platte**

	OD-Werte bei Fleischsaftverdünnung 1:100		
	<b>Plattenbeschichtung mit</b>		
Proben Nr.	C.c.	C.jej.	Mix
1	0,145	0,262	0,252
2	0,275	0,184	0,325
3	0,218	0,132	0,204
4	0,330	0,188	0,343
5	0,203	0,101	0,184
6	0,300	0,254	0,362

In den **Tabellen 87 bis 90** vergleichend OD-Werte von Feldfleischsaftproben aus unterschiedlichen Einsendungen (FS) in Verdünnungen von 1:30 und 1: 100 auf Mix (C.c./C.jej.) Beschichtungen mit den Ergebnissen der Salmonellen-Antikörper Bestimmung dargestellt.

**Tabelle 87 Darstellung der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben (FS 22) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung**

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>			
Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung		Salmotype®-ELISA
	1:30	1:100	Ergebnis
1	1,630	0,757	neg
2	0,904	0,394	neg
3	0,903	0,460	neg
4	0,840	0,333	neg
5	0,690	0,305	neg
6	1,170	0,553	neg
7	1,175	0,521	neg
8	0,897	0,502	neg
9	0,800	0,355	neg
10	0,630	0,267	neg
11	1,056	0,521	neg
12	0,987	0,471	neg
13	0,783	0,279	neg
14	0,631	0,268	neg

**Tabelle 88** Darstellung der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben (FS 23) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>			
	OD-Werte bei Serumverdünnung		Salmotype®-ELISA
Proben Nr.	1:30	1:100	Ergebnis
1	1,150	0,695	neg
2	0,951	0,513	neg
3	0,851	0,470	neg
4	1,154	0,781	neg
5	0,727	0,325	neg
6	0,807	0,453	neg
7	1,193	0,546	neg
8	1,194	0,581	neg
9	0,862	0,577	neg
10	0,805	0,463	neg
11	0,929	0,388	neg
12	0,880	0,415	neg
13	0,770	0,404	neg
14	0,651	0,298	neg

**Tabelle 89** Darstellung der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben (FS 24) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>			
	OD-Werte bei Serumverdünnung		Salmotype®-ELISA
Proben Nr.	1:30	1:100	Ergebnis
1	0,891	0,538	neg
2	0,681	0,340	neg
3	0,622	0,299	neg
4	0,365	0,148	neg
5	0,702	0,341	neg
6	0,665	0,271	neg
7	0,336	0,165	neg
8	0,654	0,252	neg
9	0,723	0,289	neg
10	0,547	0,187	neg
11	0,635	0,279	neg
12	0,510	0,220	neg
13	0,569	0,319	neg
14	0,841	0,409	neg
15	0,568	0,270	neg

**Tabelle 90** Darstellung der OD-Werte von 1:30 und 1:100 verdünnten Feldfleischsaftproben (FS 25) auf einer mit C.c./C.jej.-Mischantigen (Mix) beschichteten Platte sowie der Ergebnisse der Salmonellen-Antikörperbestimmung

<b>Plattenbeschichtung Mix (C.c. / C.jej)</b>			
Proben Nr.	OD-Werte bei Serumverdünnung		Salmotype®-ELISA
	1:30	1:100	Ergebnis
1	0,468	0,222	neg
2	0,573	0,253	neg
3	0,706	0,422	neg
4	0,857	0,486	neg
5	0,651	0,346	neg
6	0,644	0,384	neg
7	0,780	0,342	neg
8	0,661	0,282	neg
9	0,537	0,211	neg
10	0,791	0,442	neg
11	0,477	0,221	neg
12	0,520	0,211	neg
13	0,479	0,216	neg
14	0,634	0,292	neg
15	0,523	0,208	neg

**Tabelle 91 Plattenhomogenität bei mit C.c., C.jej. und C.c./C.jej.-Mischantigen beschichteten Mikrotiterplatten**

Platten- Position	Plattenbeschichtung		
	mit C. jej.	mit C. c.	C.c./C. jej.
	OD-Werte	OD-Werte	OD-Werte
A1	1,272	1,267	1,273
A2	1,156	1,302	1,187
A3	1,168	1,246	1,264
A4	1,081	1,208	1,306
A5	1,004	1,140	1,253
A6	1,167	1,179	1,199
A7	1,110	1,121	1,333
A8	0,979	1,259	1,270
A9	1,228	1,275	1,172
A10	1,138	1,151	1,247
A11	1,226	1,223	1,391
A12	1,124	1,165	1,486
B1	1,140	1,274	1,231
B2	1,134	1,374	1,096
B3	1,137	1,179	1,072
B4	1,234	1,171	1,120
B5	1,110	1,337	1,135
B6	1,165	1,254	1,360
B7	1,135	1,268	1,200
B8	1,196	1,400	1,201
B9	1,102	1,293	1,193
B10	1,208	1,430	1,213
B11	1,193	1,309	1,273
B12	1,158	1,189	1,547
C1	1,285	1,076	1,185
C2	1,190	1,330	1,126
C3	1,393	1,338	1,243
C4	1,413	1,263	1,130
C5	1,424	1,233	1,260
C6	1,470	1,339	1,232
C7	1,185	1,308	1,370
C8	1,471	1,398	1,392
C9	1,595	1,311	1,304
C10	1,466	1,410	1,298
C11	1,499	1,221	1,323
C12	1,363	1,131	1,402

## Fortsetzung Tabelle 91

Platten- Position	Plattenbeschichtung		
	mit C. jej.	mit C. c.	C.c./C. jej.
	OD-Werte	OD-Werte	OD-Werte
D1	1,330	1,318	1,193
D2	0,928	1,069	1,217
D3	1,218	1,291	1,102
D4	1,095	1,482	1,131
D5	1,269	1,515	1,167
D6	1,572	1,259	1,403
D7	1,114	1,266	1,254
D8	1,397	1,497	1,362
D9	1,261	1,491	1,335
D10	1,297	1,468	1,338
D11	1,278	1,405	1,359
D12	1,333	1,133	1,378
E1	1,165	1,215	0,976
E2	1,189	1,571	1,283
E3	1,099	1,213	1,151
E4	1,133	1,405	1,156
E5	1,264	1,242	1,269
E6	1,400	1,516	1,364
E7	1,258	1,282	1,348
E8	1,137	1,367	1,361
E9	1,306	1,500	1,114
E10	1,221	1,465	1,268
E11	1,341	1,312	1,262
E12	1,247	1,358	1,277
F1	1,130	1,302	1,284
F2	1,248	1,429	1,476
F3	1,198	1,550	1,229
F4	1,177	1,265	1,128
F5	1,320	1,509	1,181
F6	1,463	1,135	1,383
F7	1,207	1,281	1,306
F8	1,378	1,450	1,271
F9	1,439	1,317	1,128
F10	1,312	1,303	1,283
F11	1,126	1,339	1,288
F12	1,318	1,256	1,349

## Fortsetzung Tabelle 91

Platten- Position	Plattenbeschichtung		
	mit C. jej.	mit C. c.	C.c./C. jej.
	OD-Werte	OD-Werte	OD-Werte
G1	1,126	1,325	1,081
G2	1,327	1,372	1,059
G3	1,340	1,279	1,401
G4	1,216	1,221	1,208
G5	1,442	1,332	1,193
G6	1,336	1,243	1,105
G7	1,377	1,326	1,194
G8	1,418	1,404	1,272
G9	1,303	1,400	1,226
G10	1,267	1,288	1,187
G11	1,318	1,284	1,264
G12	1,293	1,067	1,474
H1	1,150	1,473	1,178
H2	1,250	1,373	1,325
H3	1,175	1,315	1,385
H4	1,094	1,184	1,342
H5	1,276	1,305	1,313
H6	1,220	1,232	1,348
H7	1,235	1,276	1,183
H8	1,106	1,314	1,227
H9	1,252	1,449	1,369
H10	1,091	1,304	1,308
H11	1,230	1,306	1,304
H12	1,054	1,208	1,352
Mittelwert	1,24357292	1,30654167	1,25998958
Standardabw.	0,12822248	0,11174745	0,10488947
Var.-Koeff.	10,30%	8,60%	8,30%

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

ALLSUP, T.N., HUNTER, D. (1973):

The isolation of vibrios from diseased and healthy calves: Part 1: Laboratory.  
Vet. Rec. 93, 389-392

AL-MASHAT, R.R., TAYLOR, D.J. (1980):

Production of diarrhoea and dysentery in experimental calves by feeding pure cultures of *Campylobacter fetus* subspecies jejuni.  
Vet. Rec. 107, 459-464

AL-MASHAT, R.R., TAYLOR, D.J. (1983):

Production of enteritis in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Campylobacter fetus* subspecies intestinalis.  
Vet. Rec. 112, 54-58

ATANASSOVA, V., ALTEMEIER, J., KRUSE, K.-P., DOLZINSKI, B. (1998):

Nachweis von Salmonellen und *Campylobacter* aus frischem Geflügelfleisch. Vergleichende Untersuchungen über kulturelle Methoden.  
Fleischwirtschaft 78(4), 364-366

BABAKHANI, F.K., BRADLEY, G.A., JONES, L.A. (1993):

Newborn Piglet Model for *Campylobacteriosis*.  
Infect. Immun. 61(8), 3466-3475

BANFFER, J.R.J. (1985):

Biotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from patients, pigs and chickens in the region of Rotterdam.  
J. Infect. 10, 277-281

BEERY, J.T., HUGDAHL, M.B., DOYLE, M.P. (1988):

Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*.  
Appl. Environ. Microbiol. 54, 2365-2370

BELL, J.A., MANNING, D.D. (1990):

A domestic ferret model of immunity to *Campylobacter jejuni*-induced enteric disease.  
Infect. Immun. 58, 1848-1852

BISPING, W., AMTSBERG, G. (1988):

Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. / Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

BLACK, R.E., LEVINE, M.M., CLEMENTS, M.L., HUGHES, T.P., BLASER, M.J. (1988):

Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans.  
J. Infect. Dis. 157, 472-479

BLACK, R.E., PERLMAN, D.M., CLEMENTS, M.L., LEVINE, M.M., BLASER, M.J. (1992):

Human volunteer studies with *Campylobacter jejuni*, p.207-215. In

NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMPKINS, L.S. (1992):

*Campylobacter jejuni*: current status and future trends.

American Society for Microbiology, Washington, D.C.

BLASER, M.J., HARDESTY, H.L., POWERS, B., WANG, W.-L. L. (1980):

Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Biological Milieus.

J. Clin. Microbiol. 11 (4), 309-313

BLASER, M.J., DUNCAN, D.J. (1984):

Human serum antibody response to *Campylobacter jejuni* infection as measured in an enzyme-linked immunosorbent assay.

Infect. Immun. 44, 292-298

BOLLA, J.M., LORET, E., ZALEWSKI, M., PAGES, J.M. (1995):

Conformational analysis of the *Campylobacter jejuni* porin.

J. Bacteriol. 177, 4266-4271

BOLTON, F.J., HUTCHINSON, D.N., COATES, D. (1984):

Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces.

J. Clin. Microbiol. 19(2), 169-171

BOLTON, F.J., SAILS, A.D., FOX, A.J., WAREING, D.R., GREENWAY, D.L. (2002):

Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay.

J. Food Prot. 65(5), 760-767

BOOSINGER, T.R., POWE, T.A. (1988):

*Campylobacter jejuni* infections in gnotobiotic pigs.

Am. J. Vet. Res. 49, 456-458

BORCH, E., NESBAKKEN, T., CHRISTENSEN, H. (1996):

Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria.

Int. J. Food Microbiol. 30 (1-2), 9-25

BOTTELDOORN, N., HEYNDRIKX, M., RIJPENS, N., HERMAN, L. (2001):

The prevalence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *VTEC* in pig farms.

Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork. 2-5 Sept. 2001, Leipzig, Germany

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) (1998):

*Campylobacter jejuni* – als Erreger bakterieller Lebensmittelinfektionen vielfach unterschätzt.

06/98, 9. März 1998

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) (2000a):

Weltweit steigt die Zahl der Lebensmittelinfektionen-4. Weltkongress in Berlin 23/2000, 12.Oktober 2000

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) (2000b):

Deutscher Zoonosen- Trendbericht über 2000/ Kapitel 2-Campylobacter  
www.bgvv.de

BURNENS, A., STUCKI, U., NICOLET, J., FREY, J. (1995):

Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*.

J. Clin. Microbiol. 33(11), 2826-2832

BURR, D.H., CALDWELL, M.B., BOURGEOIS, A.L., MORGAN, H.R., WISTAR, R.JR., WALKER, R.I. (1988):

Mucosal and systemic immunity to *Campylobacter jejuni* in rabbits after gastric inoculation.

Infect. Immun. 56, 99-105

BUTZLER, J.-P., OOSTEROM, J. ( 1991):

*Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods.

Int. J. Food Microbiol. 12, 1-8

CAWTHRAW, S., AYLING, R., NUIJTEN, P., WASSENAAR, T., NEWELL, D.G. (1994):

Isotype, Specificity, and Kinetics of Systemic and Mucosal Antibodies to *Campylobacter jejuni* Antigens, including Flagellin, during Experimental Oral Infection of Chickens.

Avian Dis. 38, 341-349

CAWTHRAW, S.A., WASSENAAR, T.M., AYLING, R., NEWELL, D.G. (1996):

Increases colonization potential of *Campylobacter jejuni* strain 81116 after passage through chickens and its implication on the rate of transmission within flocks.

Epidemiol. Infect. 117(1), 213-215

CAWTHRAW, S.A., LIND, L., KAIJSER, B., NEWELL, D.G. ( 2000):

Antibodies, directed towards *Campylobacter jejuni* antigens, in sera from poultry abattoir workers.

Clin. Exp. Immunol. 122, 55-60

CLOAK, O.M., FRATAMICO, P.M. (2002):

A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profilest.

J. Food Prot. 65(2), 266-273

- DAHME, E., WEISS, E. (1999):  
Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.  
5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- DE MELO, M.A., PECHÈRE, J.-C. (1990):  
Identification of campylobacter jejuni surface proteins that bind to eucaryotic cells in vitro.  
Infect. Immun. 58, 1749-1756
- DOYLE, L.P. (1944):  
A vibrio associated with swine dysentery.  
Am. J. Vet. Res. 5, 3-5
- DOYLE, M.P., ROMAN, D.J. (1981):  
Growth and Survival of Campylobacter fetus spp. jejuni as a function of temperature and pH.  
J. Food Prot. 44 (8), 596-601
- DOYLE, M.P., ROMAN, D.J. (1982):  
Sensitivity of Campylobacter jejuni to drying.  
J. Food Prot. 45, 507-510
- ESCHERICH, T. (1881):  
Beiträge zur Kenntnis der Darmbakterien. III. Über das Vorkommen von Vibrionen im Darmkanal und den Stuhlgängen der Säuglinge.  
Münch. Med. Wochenschr. 33, 815-817
- ESSER, P. (1997):  
Aspects of Nunc MaxiSorp™ Microwell™ Certification.  
NUNC™, Brand Products, Bulletin No. 4
- FIREHAMMER, B.D., MYERS, L.L. (1981):  
Campylobacter fetus subsp. jejuni: its possible significance in enteric disease of calves and lambs.  
Am. J. Vet. Res., 42, 918-922
- FOX, J.G., MOORE, R., ACKERMAN, J.I. (1983):  
Canine and feline campylobacteriosis: epizootiology and clinical and public health features.  
J. Am. Vet. Med. Ass. 183, 1420-1424
- FOX, J.G., ACKERMAN, J.I., TAYLOR, N., CLAPS, M., MURPHY, J.C. (1987):  
Campylobacter jejuni infection in the ferret: an animal model of human campylobacteriosis.  
Am. J. Vet. Res. 48, 85-89
- FUJIMOTO, S., FUJITA, M. (1999):  
Serum antibody level against GroEL protein type heat-shock protein of Campylobacter jejuni in patients with Guillain- Barré syndrome.  
Microbiol. Immunol. 43, 241-244

- GAULL, F., ALTER, T., FROEB, A., FEHLHABER, K. (2001):  
Campylobacter in pigs: an epidemiological study.  
Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Foodborne Pathogens in Pork. 2-5 Sept. 2001, Leipzig, Germany.
- GIESSEN, A., MAZURIER, S.I., JACOBS-REITSMA, W., JANSEN, W., BERKERS, P., RITMEESTER, W., WERNARS, K., VAN-DE-GIESSEN, A. (1992):  
Study on the epidemiology and control of Campylobacter jejuni in poultry broiler flocks.  
Appl. Environ. Microbiol. 58, 1913-1917
- GILL, C.O. , BRYANT, J. (1993):  
The presence of Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter in pig carcasses dehairing equipment.  
Food Microbiol. 10, 337-344
- GLÜNDER, G., WEBER, R. (2000):  
Campylobacter beim Geflügel. Eine Übersicht über die Bedeutung und Bekämpfungsmöglichkeiten.  
Lohmann Informationen 4, 39-48
- GÖRGEN, M. (1982):  
Untersuchungen zum Vorkommen von Bakterien der Gattung Campylobacter im Schweinedarm mit einem Beitrag zu ihrer Isolierung und Differenzierung.  
Vet. Med. Diss., Tierärztl. Hochsch. Hannover
- GÖRGEN, M., KIRPAL, G, BISPING W. (1983):  
Untersuchungen zum Vorkommen von Keimen der Gattung Campylobacter beim Schwein. Teil I: Kulturelle Untersuchungen von Kot, Darminhalt und Gallenblasen sowie Infektionsversuche.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 86-89
- GRANT, C.C.R., KONKEL, M.E., CIEPLAK, W., TOMPKINS, L.S. (1993):  
Role of flagellar in adherence, internalization and translocation of campylobacter jejuni in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures.  
Infect. Immun. 61, 1764-1771
- HAAS, B., HINZ, K.-H., GLÜNDER, G. (1999):  
Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Chickens.  
J. Vet. Med. B 46, 163-171
- HARVEY, R.B., YOUNG, C.R., ZIPRIN, R.L., HUME, M.E., GENOVESE, K.J., ANDERSON, R.C., DROLESKEY, R.E., STANKER, L.H., NISBET, D.J. (1999):  
Prevalence of Campylobacter spp. isolated from the intestinal tracts of pigs raised in an integrated swine production system.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 215, 1601-1604

HARVEY, R.B., YOUNG, C.R., ANDERSON, R.C., DROLESKEY, R.E., GENOVESE, K.J., EGAN, L.F., NISBET, D.J. (2000):  
Diminution of *Campylobacter* colonization in neonatal pigs reared off-sow.  
J. Food Prot. 63(10), 1430-1432

HARVEY, R.B., ANDERSON, R.C., YOUNG, C.R., SWINDLE, M.M., GENOVESE, K.J., HUME, M.E., DROLESKEY, R.E., FARRINGTON, L.A., ZIPRIN, R.L., NISBET, D.J. (2001):  
Effects of feed withdrawal and transport on cecal environment and *Campylobacter* concentrations in a swine surgical model.  
J. Food Prot. 64(5), 730-733

HERBRINK, P., VAN DEN MUNCKHOF, H.A.M., BUMKENS, M., LINDEMAN, J., VAN DIJK, W.C. (1988):  
Human serum antibody response in *Campylobacter jejuni* enteritis as measured by enzyme-linked immunosorbent assay.  
J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 7, 388-393

HOFFMAN, P.S., KRIEG, N.R., SMIBERT, R.M. (1979):  
Studies on the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*.  
Can. J. Microbiol. 25, 1-7

JANVIER, B., AYRAUD, S., BEBY-DEFAUX, A., FAUCHERE, J.L. (2000):  
Immunogens of interest for the diagnosis of *campylobacter jejuni* infections.  
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 27(3), 263-268

JOHANSEN, H.K., NORGAARD, A., ANDERSEN, L.P., JENSEN, P., NIELSEN, H., HOIBY, N. (1995):  
Cross-reactive antigens shared by *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*.  
Clin. Diagn. Lab. Immun. 2, 149-155

JONES, F.S., ORCUTT, M., LITTLE, R.B. (1931):  
*Vibriosis* (*Vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves.  
J. Exp. Med. 53, 853-864

JONES, D.M., SUTCLIFFE, E.M., RIOS, R., FOX, A.J., CURRY, A. (1993):  
*Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment.  
J. Med. Microbiol. 38, 145-150

KALDOR, J., PRITCHARD, H., SERPELL, A.: METCALF, W. (1983):  
Serum antibodies in *Campylobacter* enteritis.  
J. Clin. Microbiol. 18, 1-4

KANTELE, A.M., TAKANEN, R., ARVILOMMI, H. (1988):  
Immune response to acute diarrhea seen as circulating antibody-secreting cells.  
J. Infect. Dis. 158(5), 1011-1016

KARMALI, M.A., SIMOR A.E., RASCOE, M., FLEMING, P.C., SMITH, S.S., LANE, J. (1986):

Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of Campylobacter organisms from feces.

J. Clin. Microbiol. 23(3), 456-459

KEMENY, D.M. (1994):

ELISA, Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

KING, E.O. (1957):

Human infections with Vibrio fetus and a closely related vibrio.

J. Infect. Dis. 101, 119-128

KIST, M. ( 1983):

Infektionen durch Campylobacter jejuni / coli.

Dtsch. Med. Wschr. 108, 67-71

KITA, E., OKU, D., HAMURO, A., NISHIKAWA, F., EMOTO, M., YAGYU, Y., KATSUI, N., KASHIBA, S. (1990):

Hepatotoxic activity of campylobacter jejuni.

J. Med. Microbiol. 33, 171-182

KÖTSCHE, W. (1993):

Campylobacter jejuni, Campylobacter coli.

AVID-Mitteilung II

KOWALCZYK, K., DAISS, J., HALPERN, J., ROTH, T.F. (1985):

Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken.

Immunology 54, 755-762

KRAMER, J.M., FROST, J.A., BOLTON, F.J., WAREING, D.R.A. (2000):

Campylobacter Contamination of Raw Meat and Poultry at Retail Sale: Identification of Multiple Types and Comparison with Isolates from Human Infection.

J. Food Protect. 63, 1654-1659

KRAMER, T., HÖSCHLER, K., KALTSCHMIDT, B., GRIMMECKE, D., THÜRASCH, K., GABERT, J. (2001):

Detection of Campylobacter Antibodies in Swine Meat Juice - A first case study.

Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella and other Foodborne Pathogens in Pork. 2-5 Sept. 2001, Leipzig, Germany

KRAUSS, H., WEBER, A., ENDERS, B., SCHIEFER, H. G., SLENCZKA, W., ZAHNER, H. (1997):

Campylobacter-Infektionen.

Zoonosen, 25-28, Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

KUHN, C. (2001):

Persönliche Mitteilung  
Charles River Sulzfeld

LANE, E.M., BATCHELOR, R., BOURGEOIS, A.L., BURR, D.H., OLSON, J.G.  
(1987):

Urine and fecal IgA responses during naturally acquired infection with *Campylobacter jejuni*.

Lancet I: 1141.(Letter.)

LANGE, D., ALEKSIC, S., KASSUBEK, J., VRVIC, M.M., KIST, M.,  
STEINBRUCKNER, B., MITOVA, M. (1999):

Detection of antibodies against *Campylobacter jejuni* serogroup PEN O:19 purified flagellar protein in a patient with Guillain-Barré syndrome.

Zentralbl. Bakteriол. 289(4),429-444

LAUWERS, S., DE BOECK, M., BUTZLER, J.P. (1978):

*Campylobacter enteritis* in Brussels.

Lancet. 1, 604-605

LIOR, H., WOODWARD, D.L., EDGAR, J.A., LAROCHE, L.J., GILL, P. (1982):

Serotyping of *Campylobacter jejuni* by Slide Agglutination Based on Heat-Labile Antigenic Factors.

J. Clin. Microbiol. 15 (5), 762-768

LOGAN, S.M., TRUST, T.J. (1983):

Molecular Identification of Surface Protein Antigens of *Campylobacter jejuni*.

Infect. Immun. 42(2), 675-682

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951):

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-278

LÜNEBERG, E., JUNG, S., KARCH, H., FROSCH, M., SCHÄFER, S., FRENZEL, C.  
(2001):

Functional impact of humoral and cellular immune responses to *Campylobacter jejuni* in the pathogenesis of acute immune-mediated neuropathies.

<http://www.hygiene.uni-wuerzburg.de/pages/Cfunk.htm>

MADDEN, R.H., MORAN, L., SCATES, P. (2000):

Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract.

J. Microbiol. Meth. 42, 115-119

MANSER, P. A., DALZIEL, R. W. (1985):

A survey of *Campylobacter* in animals.

J. Hyg. Camb. 95, 15-21

MASCART-LEMONE, F.O., DUCHATEAU, J.R., OOSTEROM, J., BUTZLER, J.-P., DELACROIX, D.L. (1987):

Kinetics of anti-Campylobacter jejuni monomeric and polymeric immunoglobulin A1 and A2 response in serum during acute enteritis.

J. Clin. Microbiol. 25, 1253-1257

MC FADYEAN, J., STOCKMAN, S. (1913):

Report of the departmental committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to enquire into epizootic abortion.

His Majesty's Stationery Office London.

MOORE, J.E., MADDEN, R.H. (1998):

Occurrence of thermophilic Campylobacter spp. in porcine liver in Northern Ireland.

J. Food Prot. 61, 409-413

MOORE, J.E., GARCIA M.M., MADDEN, R.H. (2002):

Subspecies characterization of porcine Campylobacter coli and Campylobacter jejuni by multilocus enzyme electrophoresis typing.

Vet. Res. Commun. 26(1), 1-9

MOROOKA, T., UMEDA, A., AMAKO, K. (1985):

Motility as an intestinal colonization factor of campylobacter jejuni.

J. Gen. Microbio. 131, 1973-1980

NACHAMKIN, I., YANG, X.-H. (1992):

Local immune responses to the campylobacter flagellin in acute Campylobacter gastrointestinal infection.

J. Clin. Microbiol. 30, 509-511

NACHAMKIN, I., ALLOS, B.M., HO, T. (1998):

Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome.

Clin. Microbiol. Rev. 11, 555-567

NERBRINK, E. , BORCH, E. (1989):

Bacterial contamination during pig slaughtering process.

Proc. 35<sup>th</sup> Int. Congress Meat Sci. Technol., Copenhagen, Denmark. pp. 356-362

NEWELL, D.G., NACHAMKIN, I. (1992):

Immune responses directed against campylobacter jejuni. p.201-206. In:

NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMPKINS, L.S. (1992):

Campylobacter jejuni: current status and future trends.

American Society for Microbiology, Washington, D.C.

NEWELL, D.G., WAGENAAR, J.A. (2000):

Poultry infections and their control at the farm level, p. 497-509.

In I. Nachamkin and M.J. Blaser (ed.), Campylobacter, 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, D.C.

NEWTON, C.M., NEWELL, D.G., WOOD, M., BASKERVILLE, A. (1988):  
Campylobacter infection in a closed dog breeding colony.  
Vet. Rec. 123, 152-154

NIELSEN, E.M, ENGBERG, J., MADSEN, M. ( 1997):  
Distribution of serotypes of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from Danish patients, poultry, cattle and swine.  
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 19(1), 47-56

NOTERMANS, S. (1994):  
Epidemiology and surveillance of Campylobacter infections. p. 35-44  
In Report on a WHO consultation on epidemiology and control of campylobacteriosis, WHO/CDS/VPH/94.135, World Health Organization, Geneva, Switzerland

NUNC™ Brand Products (2001):  
Solid phase Guide.  
Second Edition, 7-9

OBIRI-DANSO, K., PAUL, N., JONES, K. (2001):  
The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, Campylobacter lari and urease-positive thermophilic campylobacters (UPTC) in surface waters.  
J. Appl. Microbiol. 90 (2), 256-267

OLUBUNMI, P.A., TAYLOR, D. J. (1982):  
Production of enteritis in pigs by the oral inoculation of pure cultures of Campylobacter coli.  
Vet. Rec. 111, 197-202

OOSTEROM, J., DE WILDE, G.J.A., DE BOER, E., DE BLAAUW, L.H., KARMAN, H. (1983):  
Survival of Campylobacter jejuni during poultry processing and pig slaughtering.  
J. Food Protect. 46, 702-706

OOSTEROM, J., DEKKER, R., DE WILDE, G.J.A., VAN KEMPEN-DE TROYE, F., ENGELS, G.B. (1985):  
Prevalence of Campylobacter jejuni and Salmonella during slaughtering.  
Vet. Q. 7, 31-34

OXOID-Handbuch (1993):  
5. aktualisierte deutsche Auflage  
Unipath GmbH

PALMER, D.F., WHALEY, S.D. (1986):  
Complement fixation test.  
In: Manual of Clinical Immunology (Rose, N.R., Friedman, H. and Fahey J.L., Eds.), Third Edition, American Society for Microbiology, Washington, DC.

- PALUSZAK, Z., OLSZEWSKA, H. (2000):  
Einfluß der Temperatur auf die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in gelagerter Rindergülle.  
Tierärztl. Umschau 55, 45-48
- PANCORBO, P.L., DE PABLO, M.A., ORTEGA, E., PUERTOLALANO, M.A., GALLEGO, A.M., ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. (2001):  
Potential intervention of *Campylobacter jejuni* in the modulation of murine immune response.  
Curr. Microbiol. 43(3), 209-214
- PATTON, C.M., BARRETT, T.J., MORRIS, G.K. (1985):  
Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp.  
J. Clin. Microbiol. 22, 558-565
- PENNER, J.L., HENNESSY, J.N. (1980):  
Passive Hemagglutination Technique for Serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the Basis of Soluble Heat-Stable Antigens.  
J. Clin. Microbiol. 12(6), 732-737
- PENNER, J.L., HENNESSY, J.N., CONGI, R.V. (1983):  
Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the Basis of Thermostable Antigens.  
Eur. J. Clin. Microbiol. 2(4), 378-383
- PENNER, J.L. in : BALOWS, A. (Hrsg.) (1991):  
Manual of clinical microbiology.  
Washington, D.C., 402-409
- PERREZ-PERREZ, G.I., HOPKINS, J.A., BLASER, M.J. (1986):  
Lipopolysaccharide structures in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Vibrio cholerae* are immunologically related to *Campylobacter* spp. .  
Infect. Immun. 51, 204 –208
- PHARMACIA BIOTECH (1993):  
GeneQuant RNA/DNA Calculator User Manual  
Pharmacia LKB Biochrom Ltd, England
- PRESCOTT, J.F., BARKER, I.K. (1980):  
*Campylobacter colitis* in gnotobiotic dogs.  
Vet. Rec. 7(13),314-315
- PRESCOTT, J.F., MANNINEN, K.I., BARKER, I.K. (1982):  
Experimental pathogenesis of *Campylobacter jejuni* enteritis: studies in gnotobiotic dogs, pigs and chickens. In: *Campylobacter: Epidemiology, Pathogenesis and Biochemistry*. Newell, D.G., (Ed.), MTP Press, Lancaster, pp. 170-171
- RITCHIE, A.E., KEELER, R.F., BRYNER, J.H. (1966):  
Anatomical features of *Vibrio fetus*: electron microscopic survey.  
J. Gen. Microbiol. 43, 427-438

Robert Koch-Institut (RKI), Berlin (1999):  
7. Folge: Campylobacter-Infektionen  
Epidemiologisches Bulletin 35/1999

Robert Koch-Institut (RKI), Berlin (2001):  
7. Folge: Campylobacter-Infektionen  
Epidemiologisches Bulletin 35/1999, aktualisiert Oktober 2001  
[www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM)

Robert Koch-Institut (RKI), Berlin (2002):  
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001.  
[www.rki.de/INFEKT/IFSG/Jahrbuch-2001.pdf](http://www.rki.de/INFEKT/IFSG/Jahrbuch-2001.pdf)

ROLLE, M., MAYR, A. (2002):  
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.  
7. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart

ROSEF, O. (1981):  
Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from the gallbladder of normal slaughter pigs, using an enrichment procedure.  
*Acta vet. scand.* 22, 149-151

RUIZ-PALACIOS, G.M., ESCAMILLA, E., TORRES, N. (1981):  
Experimental *Campylobacter* diarrhea in chickens.  
*Infect. Immun.* 34, 250-255

SAHIN, O., ZHANG, Q., MEITZLER, J.C., HARR, B.S., MORISHITA, T.Y., MOHAN, R. (2001):  
Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies.  
*Appl. Environ. Microbiol.* 67(9), 3951-3957

SANG, F.C., SHANE, S.M., YOGASUNDRAM, K., HAGSTAD, H.V., KEARNEY, M.T. (1989):  
Enhancement of *Campylobacter jejuni* Virulence by Serial Passage in Chicks.  
*Avian Dis.* 33, 425-430

SCHNÖTZLINGER, G. (1994):  
Vorkommen und Nachweis von Salmonellen und *Campylobacter coli* / *jejuni* beim Schlachtschwein in Österreich.  
*Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 219

SCHULZE, F., ERLER, W. (2002):  
Kolonisationsversuche mit *Campylobacter jejuni* bei Küken.  
*Dtsch. tierärztl. Wschr.* 109, 161-166

SEBALD, M., VERON, M. (1963):  
Teneur en bases de l'ADN et classification de vibrions.  
*Ann. Inst. Pasteur* 105, 897-910

- SEMMLER, M. (1999):  
Nachweis von Antikörpern gegen *Helicobacter pylori* in Seren von Schweinen und Rindern mit Hilfe von ELISA- und Westernblot- Technik.  
Vet. Med. Diss., München
- SHANE, S.M. (1992):  
The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: A review.  
Avian Pathol. 21, 189-213
- SKIRROW, M.B. (1977):  
Campylobacter enteritis: a "new" disease.  
Br. Med. J. 2, 9-11
- SKIRROW, M.B. (1991):  
Epidemiology of Campylobacter enteritis.  
Int. J. Food Microbiol. 12, 9-16
- SKIRROW, M.B. (1994):  
Diseases due to Campylobacter, Helicobacter and related bacteria.  
J. Comp. Path. 111, 113-149
- SMITH, T., TAYLOR, M.S. (1919):  
Some morphological and biological characters of the Spirilla (*Vibrio fetus* n. sp.): associated with disease of the fetal membranes in cattle.  
Arch. Exp. Med. 30, 299-313
- SMITH, T., ORCUTT, M.L. (1927):  
Vibrios from calves and their serological relation to *Vibrio fetus*.  
J. Exp. Med. 45, 391-397
- STERN, N.J., MEINERSMANN, R.J., DICKERSON, H.W. (1990):  
Influence of Antibody Treatment of *Campylobacter jejuni* on the Dose Required to Colonize Chicks.  
Avian Dis. 34, 595-601
- STICHT-GROH, V. (1982):  
Campylobacter in healthy slaughter pigs: a possible source of infection for man.  
Vet. Rec. 110, 104-106
- STOEV, S.D., GOUNDASHEVA, D., MIRTICHEVA, T., MANTLE, P.G. (2000):  
Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis.  
Exp. Toxicol. Pathol. 52(4), 287-296
- STRID, M.A., ENGBERG, J., LARSEN, L.B., BEGTRUP, K., MOLBAK, K., KROGFELT, K.A. (2001):  
Antibody responses to Campylobacter infections determined by an enzyme-linked immunosorbent assay: 2-year follow-up study of 210 patients.  
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8(2), 314-319

- STURZENHECKER, K. (1995):  
Untersuchungen zur Virulenz von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* am standardisierten Infektionsmodell „bebrütetes Hühnerei“.  
Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin
- SVEDHEM, A., KAJISER, B. (1980):  
*Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*: A common cause of diarrhea in Sweden.  
J. Infect. Dis. 142, 353-359
- SVEDHEM, A., GUNNARSSON, H., KAJISER, B. (1983):  
Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay for routine detection of IgG and IgM antibodies to *Campylobacter jejuni*.  
J. Infect. Dis. 148(1), 82-92
- TERZOLO, H.R., LAWSON, G.H.K., ANGUS, K.W., SNODGRASS, D.R. (1987):  
Enteric *Campylobacter* infection in gnotobiotic calves and lambs.  
Res. Vet. Sci. 43, 72-77
- THORNTON, S.A., LOGAN, S.M., TRUST, T.J., GUERRY, P. (1990):  
Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.  
Infect. Immun. 58, 2686-2689
- TOMPKINS, L.S. (1992):  
Genetic and Molecular Approach to *Campylobacter* Pathogenesis. p. 241-254. In  
NACHAMKIN, I., BLASER, M.J., TOMPKINS, L.S. (1992):  
*Campylobacter jejuni*: current status and future trends.  
American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- UEKI, Y., UMEDA, A., FUJIMOTO, S., MITSUYAMA, M., AMAKO, K. (1987):  
Protection against *campylobacter jejuni* infection in suckling mice by anti-flagellar antibody.  
Microbiol. Immunol. 31, 1161-1171
- VANDAMME, P., DE LEY, J. (1991):  
Proposal for a new family, *Campylobacteriaceae*.  
Int. J. System. Bacteriol. 41, 451-455
- WALLIS, M.R. (1994):  
The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*.  
Br. J. Biomed. Sci. 51(1), 57-64
- WALZ, S.E., BAQAR, S., BEECHAM, H.J., ECHEVERRIA, P., LEBRON, C., MC CARTHY, M., KUSCHNER, R., BOWLING, S., BOURGEOIS, A.L., SCOTT, D.A. (2001):  
Pre-exposure anti-*campylobacter jejuni* immunoglobulin A levels associated with reduced risk of *campylobacter* diarrhea in adults traveling to Thailand.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 65(5), 652-656

WASSENAAR, T.M., VAN DER ZEIJST, B.A.M., AYLING, R., NEWELL, D.G. (1993):  
Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression.  
J. Gen. Microbiol. 139, 1171-1175

WASSENAAR, T.M., BLEUMINK-PLYM, N.M.C., NEWELL, D.G., NUIJTEN, P.J.M.,  
VAN DER ZEIJST, B.A.M. (1994):  
Differential flagellin expression in a *flaA flaB*<sup>+</sup> mutant of *Campylobacter jejuni*.  
Infect. Immun. 62, 3901-3906.

WASSENAAR, T.M. (2000):  
Molekularmethoden als Nachweis, Spezifizierung und Subtypisierung von  
*Campylobacter* spp..  
Lohmann Information 2, 17-24.

WEBER, A. (1985):  
Vorkommen von *Campylobacter jejuni* bei Tieren und die Bedeutung für den  
Menschen.  
Tierärztl. Prax. 13, 151-157

WEBER, A., LEMBKE, C., SCHÄFER, R., (1985):  
Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Kotproben gesunder  
Schlachtschweine in Abhängigkeit von der Jahreszeit.  
Zbl. Vet. Med. B 32, 40-45

WEIJTENS, M.J.B.M., BIJKER, P.G.H., VAN DER PLAS, J.,  
URLINGS, H.A.P., BIESHEUVEL, M.H. (1993):  
Prevalence of *Campylobacter* in pigs during fattening, an epidemiological study.  
Vet. Quat. 15, 138-43

WEIJTENS, M.J.B.M., VAN DER PLAS, J., BIJKER, P.G.H., URLINGS, H.A.P.,  
KOSTER, D., VAN LOGTESTIJN, J.G., HUIS IN'T VELD, J.H.J. (1997):  
The transmission of *Campylobacter* in piggeries, an epidemiological study.  
J. Appl. Microbiol. 83, 693-698

WEIJTENS, M.J.B.M., REINDERS, R.D., URLINGS, H.A.P., VAN DER PLAS, J.  
(1999):  
*Campylobacter* infections in fattening pigs, excretion pattern and genetic diversity.  
J. Appl. Microbiol. 86, 63-70

WIDDERS, P.R., PERRY, R., MUIR, W.I., HUSBAND, A.J., LONG, K.A. (1996):  
Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*.  
British Poultry Sci. 37, 765-778

WIDDERS, P.R., THOMAS, L.M., LONG, K.A., TOKHI, M.A., PANACCIO, M., APOS,  
E. (1998):  
The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with  
*Campylobacter jejuni*.  
Vet. Microbiol. 64, 39-50

WILLIS, W.L., MURRAY, C., TALBOTT, C. (2002):  
Campylobacter Isolation Trends of Cage Versus Floor Broiler Chickens: A One-Year Study.  
Poultry Science 81, 629-631

WU, S.-J., PAZZAGLIA, G., HABERBERGER, R.L., OPRANDY, J.J., SIECKMANN, D.G., WATTS, D.M., HAYES, C. (1993):  
Detection of immunoglobulin A in urine specimens from children with Campylobacter-associated diarrhea by a chemiluminescent indicator-based Western immunoblot assay.  
J. Clin. Microbiol. 31, 1394-1396

WU, Y.L., LEE, L.H., ROLLINS, D.M., CHING, W.M. (1994):  
Heat shock- and alkaline pH- induced proteins of Campylobacter jejuni: characterization and immunological properties.  
Infect. Immun. 62, 4256-4260

WUTHE, H.H., VOLKHEIMER, A. (1986):  
Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in domestic and wild animals in Northern Germany.  
In: WHO-Proc., 2. Weltkongreß Lebensmittel-Infektionen und Intoxikationen 26.-30. Mai 1986, Berlin (West), Vol. I, 1154

YOUNG, C.R., HARVEY, R., ANDERSON, R., NISBET, D., STANKER, L.H. (2000):  
Enteric colonisation following natural exposure to Campylobacter in pigs.  
Res. Vet. Scien. 68, 75-78

ZIPRIN, R.L., HUME, M.E., YOUNG, C.R., HARVEY, R.B. (2002a):  
Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of Campylobacter jejuni: evaluation of protection against a colonizing strain.  
Curr. Microbiol. 44(3), 221-223

ZIPRIN, R.L., HUME, M.E., YOUNG, C.R., HARVEY, R.B. (2002b):  
Cecal Colonization of Chicks by Porcine Strains of Campylobacter coli.  
Avian Dis. 46, 473-477

## **Gesetze und Verordnungen**

Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz-LMBG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296)

Gesetz zur Neuordnung seuchenrechtlicher Vorschriften (Seuchenrechtsneuordnungsgesetz-SeuchRNeuG) vom 20. Juli 2000, Artikel 1:  
Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz-IfSG) (BGBl. I S. 1045)

Geltendes Gemeinschaftsrecht, Dokument 301D0029  
2001/29/EG: Entscheidung der Kommission vom 27. Dezember 2000 über eine besondere Finanzhilfe der Gemeinschaft für ein Programm zur Überwachung von Campylobacter-Erregern bei Masthähnchen und Hühnern, vorgelegt von Schweden.  
(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2000) 4154)  
Amtsblatt Nr. L 006 vom 11/01/2001 S. 0022-0024  
([http://europa.eu.int/index\\_de.htm](http://europa.eu.int/index_de.htm))

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung-FIHV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Mai 1997 (BGBL. I S. 1138)

Fleischuntersuchungsverordnung der Schweiz vom 3. März 1995 (Stand am 1. Juli 1995) gestützt auf die Artikel 29, 35, 38 und 55 der Fleischhygieneverordnung vom 1. März 1995. ([http://.admin.ch/ch/d/sr/817\\_190\\_1/.](http://.admin.ch/ch/d/sr/817_190_1/))

Tierseuchenverordnung der Schweiz vom 27. Juni 1995 (Stand am 28. Dezember 2001) gestützt auf Artikel 53 Absatz 1 des Tierseuchengesetzes vom 1. Juli 1966. ([http://.admin.ch/ch/d/sr/916\\_401/.](http://.admin.ch/ch/d/sr/916_401/))

Dokument 32001D0232

2001/232/EG: Entscheidung der Kommission vom 13.März 2001 über den Entwurf einer Verordnung des Königreichs der Niederlande über die Etikettierung von Geflügelfleisch (Amtsblatt Nr. 1084 vom 23/03/2001, S. 0057-0058).

## **Richtlinien**

Kommissionsvorschläge, Dokument 599PC0004

Vorschlag für eine Richtlinie des europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinie 92/117/EWG über Maßnahmen zum Schutz gegen bestimmte Zoonosen bzw. ihre Erreger bei Tieren und Erzeugnissen tierischen Ursprungs zur Verhütung lebensmittelbedingter Infektionen und Vergiftungen.

## **Herzlichen Dank**

Herrn Prof. Dr. A. Stolle für die Annahme des Themas dieser Dissertation.

Herrn Dr. H. Stöppler für die Anregung zu diesem Thema und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt -Diagnostikzentrum- Aulendorf.

Frau Dr. B. Freiberg und Herrn Dr. W. Unglaub für die unermüdliche Betreuung, Unterstützung und Beratung bei dieser Arbeit.

Frau Dr. S. Bracknies und Herrn Dr. B. Gylstorff für die stets freundliche Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. J. E. Lohr für das Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit und für die wertvollen Verbesserungsvorschläge für die Verfassung des Manuskriptes.

Herrn Dr. U. Gundlich vom Schweinegesundheitsdienst Aulendorf für die sehr entgegenkommende Unterstützung bei der Immunisierung der Serumschweine sowie für die Bereitstellung von Feldmaterial.

Frau B. Bausch und bei Frau D. Falk für die hervorragende technische Unterstützung im Labor und die sehr gute Zusammenarbeit sowie allen anderen, hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Amtes, die mich jederzeit freundlich unterstützten.

Herrn Prof. Dr. R. Böhm, Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim für seinen Einsatz zur Bereitstellung der Schweine für die Immunisierung auf der Versuchsstation für Tierhaltung am Unteren Lindenhof in Eningen.

Herrn Peitz, Leiter der Versuchsstation für Tierhaltung am Unteren Lindenhof in Eningen und seinen Mitarbeitern für die hervorragende Organisation und Unterstützung bei der Immunisierung der Schweine.