

Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *Campylobacter jejuni*
von der Eierschale in den Eihalt

von Eva-Maria Daldrup

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

**Untersuchungen zur Übertragbarkeit von *Campylobacter jejuni*
von der Eierschale in den Eihalt**

von Eva-Maria Daldrup aus Herne

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch: Dr. Samart Dorn-In, M. Sc. VPH und Prof. Dr. Karin Schwaiger

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis
Korreferent: Prof. Dr. Frank Ebel

Tag der Promotion: 17.07.2021

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

API	Analytical Profile Index
asp	Aspartatkinase-Gen
a_w	Wasseraktivität
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
C.	<i>Campylobacter</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDT	cytolethale distending toxin
Cdt	cytolethale distending toxin
C_t	cycle threshold
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTC	5-cyano-2,3-di-4-tolyltetrazoliumchlorid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EFSA	European Food Safety Authority
EMA	Ethidium-Monoazid
flaA	Flagellin-A-Gen
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ISO	Internationale Organisation für Normung
k. I.	keine Information
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
L	large
l	Liter
LED	Leuchtdiode
M	medium
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
m ²	Quadratmeter
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MALDI	Matrix-Assistierte-Desorption-Ionisierung
mCCD	modifiziertes Aktivkohle-Cefoperazon-Desoycholat
mCCDA	modifizierter Aktivkohle-Cefoperazon-Desoycholat-Agar
mM	Millimolar
MPN	Most Probable Number
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i>	Stichprobenumfang
n.b.	nicht bestimmbar
n.n.	nicht nachgewiesen
n.d.	nicht differenziert
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung

PC	plate count
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	pH-Wert
pm	Pikometer
PMA	Propidium-Monoazid
qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFU	Relative Fluorescence Unit
RFU	relative fluorescence units
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleinase
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Realtime-Polymerase Chain Reaction
S	Svedberg
s.R.	schwache Reaktion
SPF	spezifisch pathogenfrei
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Susp.	Suspension
T _m	Schmelztemperatur
TOF	time of flight
™	(Unregistered) Trademark
v	variabel
VBNC	viable but nonculturable
VWR	Van Waters & Rogers
W	Watt
WDCM	World Data Centre for Microorganisms

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	15
2	Literatur.....	17
2.1	<i>Campylobacter</i> spp.	17
2.1.1	Taxonomie und Eigenschaften	17
2.1.2	Vorkommen und Bedeutung für Lebensmittel	19
2.1.3	Vorkommen auf Eiern	22
2.1.4	Viable But Non-Culturable (VBNC)	24
2.1.5	Zoonotisches Potential und Pathogenese beim Menschen	26
2.2	Nachweis und Bestätigung von <i>Campylobacter</i> spp.	28
2.2.1	Kultureller Nachweis	28
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.2.3	MALDI-TOF MS	32
2.3	Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien	34
2.3.1	Messung der metabolischen Aktivität.....	34
2.3.2	Molekularbiologische Methoden	34
2.3.2.1	Nachweis von mRNA.....	34
2.3.2.2	Nachweis der Membranintegrität	35
3	Material.....	37
3.1	Eierproben.....	37
3.1.1	SPF-Eier.....	37
3.1.2	Eier aus dem Handel.....	37
3.2	Mikrobiologische Materialien	38
3.2.1	Referenzstamm	38
3.2.2	Nährmedien.....	38
3.2.3	Verbrauchsmaterial	38
3.3	Geräte	40
4	Methoden.....	43

4.1	Anzucht des Referenzstamms von <i>Campylobacter jejuni</i>.....	43
4.2	Bestimmung der Mikrobiota auf SPF-Eiern	44
4.3	Challengeversuche mit Eiern	44
4.3.1	Methodischer Ablauf.....	44
4.3.2	Herstellung des Inokulums	44
4.3.3	Künstliche Applikation mit <i>Campylobacter jejuni</i>	45
4.3.4	Trennen von Eidotter und Eiklar	46
4.4	Mikrobiologische Untersuchung auf <i>Campylobacter jejuni</i>	46
4.4.1	Eierschale.....	46
4.4.2	Einhalt.....	47
4.5	Molekularbiologische Untersuchung auf <i>Campylobacter jejuni</i>.....	48
4.5.1	Methode der DNA-Extraktion	48
4.5.1.1	Einhalt.....	48
4.5.1.2	Eierschale.....	52
4.5.1.3	Reinkultur auf Festmedien	52
4.5.2	qPCR.....	54
4.5.3	Spezifität und Sensitivität des qPCR-Protokolls.	55
4.6	MALDI-TOF MS	55
4.7	Lebend-Tot-Differenzierung mittels Propidium-Monoazid (PMA).....	56
4.7.1	Behandlung der Probe mit PMA.....	56
4.7.2	DNA-Extraktion und qPCR	57
4.8	Untersuchung der Eierproben aus dem Handel.....	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Mikrobiota auf Eiern	59
5.2	DNA-Extraktionsmethode	60
5.3	Spezifität und Sensitivität der qPCR für <i>Campylobacter jejuni</i>.....	61
5.4	Übertragung der <i>Campylobacter jejuni</i> von der Schale in den Eihalt.....	65
5.5	Auswahl der PMA-Konzentration	68

5.6	Eier aus dem Handel	69
6	Diskussion.....	71
6.1	Mikrobiota auf Eiern	71
6.2	Überprüfung der DNA-Extraktionsmethoden.....	72
6.3	Übertragung der <i>Campylobacter jejuni</i> von der Schale in den Eihalt.....	75
6.4	Auswahl der PMA-Konzentration	77
6.5	Vorkommen der <i>Campylobacter jejuni</i> in den Eierproben aus dem Handel	78
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	85
9	Literaturverzeichnis	87
10	Abbildungsverzeichnis.....	109
11	Tabellenverzeichnis.....	111
12	Danksagung	113

1 Einleitung

Die durch *Campylobacter* spp. ausgelöste Erkrankung, die Campylobakteriose, ist eine weltweit verbreitete Zoonose und die häufigste bakteriell ausgelöste lebensmittelassoziierte Durchfallerkrankung beim Menschen. Die Zahl der Erkrankungen durch *Campylobacter* spp. liegt seit 2005 über der Zahl der *Salmonella*-Ausbrüche, die zuvor die Statistik anführte (EFSA, 2018). In der Europäischen Union wurden 2017 insgesamt 246.158 Infektionsfälle registriert, während die Zahl der *Salmonella*-Erkrankungen bei 91.662 lag. Die Infektion erfolgt fast ausschließlich durch kontaminierte Lebensmittel. Als Infektionsquelle kommen ungenügend gegartes Geflügelfleisch, rohe Milch und Milchprodukte, Schweine- und Rindfleisch, nicht behandeltes Trinkwasser, kontaminierte Oberflächengewässer und die direkte Übertragung in Betracht (Bronowski et al., 2014). Die Zahl der durch *Campylobacter* spp. verursachten Krankheitsausbrüche steigt stetig (EFSA, 2018). 90 % dieser Fälle sind auf *C. jejuni* zurückzuführen (Bolinger und Kathariou, 2017).

Zur Eindämmung der Campylobakteriose beim Menschen existiert mit der Verordnung (EU) 2017/1495 bereits eine rechtliche Grundlage in der Europäischen Union, die sich auf *Campylobacter* spp. in Schlachtkörpern von Masthähnchen bezieht. Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Legehennen gilt zwar als hoch, bisher wurden aber keine konkreten Maßnahmen entwickelt, um sie zu eindämmen (BfR, 2018).

Eier gelten als zu vernachlässigende Infektionsquelle von *Campylobacter* spp., allerdings ist bisher nicht ausreichend wissenschaftlich untersucht worden, ob diese Einschätzung gerechtfertigt ist. Die vorliegende Arbeit hat daher zum Ziel, mit Hilfe von Challengeuntersuchungen zu überprüfen, inwieweit *Campylobacter* spp. auf der Eierschale beim Aufschlagen und Trennen in den Eiinhalt übertragen werden können. Um potenziell vorhandene *Campylobacter* spp. im VBNC-Status (Viable But Non-Culturable) erfassen zu können, wird dazu eine PMA-qPCR entwickelt und auch für die Untersuchung von Handelseiern eingesetzt.

2 Literatur

2.1 *Campylobacter* spp.

2.1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Die Gattung *Campylobacter* zählt zusammen mit den *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* und *Thiovulum* zu der Familie der *Campylobacteriaceae* (Miroshnichenko et al., 2004). Der Gattungsname *Campylobacter* wurde von Sebald und Veron (1963) geschaffen. Früher wurden sie zu der Familie *Vibrionaceae* gezählt. Das Fließschema in Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Taxonomie von *Campylobacter*. Derzeit umfasst die Gattung der *Campylobacter* 27 Spezies und acht Subspezies (siehe Ngulukun (2017)).

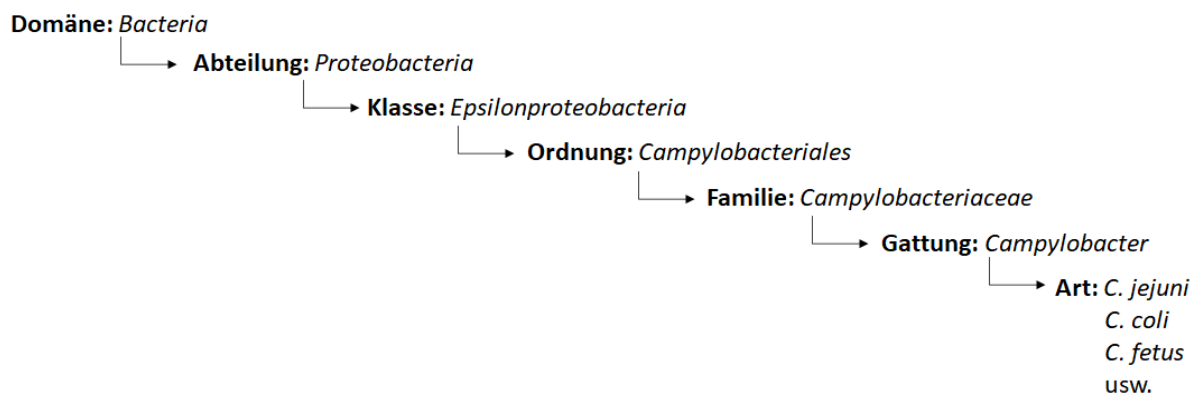


Abbildung 1: Fließschema zur Taxonomie von *Campylobacter* (modifiziert nach Garrity et al. (2004))

Campylobacter spp. sind spiralförmige, gramnegative Stäbchenbakterien, die zum Ende schmaler werden. Sie haben eine Länge von 1,5–6,0 µm und eine Breite von 0,2–0,5 µm. An einem oder beiden Enden besitzen sie ein Flagellum, das eine hohe Motilität ermöglicht (Ferrero und Lee, 1988). Abbildung 2 stellt *Campylobacter* spp. unter dem Mikroskop dar.

Campylobacter spp. sind mikroaerophil, d.h. sie benötigen eine Konzentration von 3–15 % O₂ und eine CO₂-Konzentration von 3–5 %, um sich zu vermehren. Bezüglich ihres jeweiligen Temperaturoptimums gibt es zwischen den Stämmen deutliche Unterschiede (Terzieva und McFeters, 1991; Buswell et al., 1998). Es wird zwischen thermophilen und nicht-thermophilen Arten unterschieden. Die thermophilen haben ihr Wachstumsoptimum zwischen 37 °C und 42 °C (Park, 2002). Zu diesen gehören *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*. Die nicht-thermophilen Arten, wie z. B. *C. fetus* (Baylis et al., 2000), wachsen am besten zwischen 25 °C

und 37 °C. Die Bakterien können keine Kohlenhydrate verwerten oder oxidieren. Zudem sind sie Oxidase-positiv, können Nitrat zu Nitrit reduzieren und bilden Katalase (Köhler et al., 2001).



Abbildung 2: *Campylobacter* spp. (RKI, 2018)

Am besten wachsen thermophile *Campylobacter* spp. bei 42 °C, weshalb sie häufig im Darm von Warmblütern und vor allem Vögeln vorkommen (Ketley, 1997). *Campylobacter* spp. zählen zu den fakultativ intrazellulären Bakterien (Young et al., 2007).

Insgesamt weisen *Campylobacter* spp. eine geringe Tenazität auf (Park, 2002). Sie sind hitzeempfindlich und werden durch Sterilisation und Pasteurisation inaktiviert (Shane, 2000). Bei Temperaturen unter 30 °C sind sie nicht mehr in der Lage, sich zu vermehren (Stanley et al., 1998). So sind sie unter anderem sehr empfindlich gegenüber Austrocknung (a_w -Wert < 0,97) und überleben nur kurze Zeit in einer trockenen Umgebung. *Campylobacter* spp. wachsen nicht bei einem a_w -Wert von unter 0,90 (Chirife et al., 1996). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Tenazität von thermophilen *Campylobacter* spp.

Tabelle 1: Tenazität thermophiler *Campylobacter* spp. (modifiziert nach Anonymus (1996))

Parameter	Minimum	Optimum	Maximum
Temperatur	–	37–42 °C	60 °C
a_w -Wert	> 0,987	0,997	–
NaCl-Konzentration	–	0,5	1,5
pH-Wert	> 4,0	6,5–7,5	9–9,5
Atmosphäre	–	5 % O ₂ , 10 % CO ₂	–

– = nicht bekannt

Als Energiequelle nutzen sie Aminosäuren wie zum Beispiel Aspartat oder Metabolite des Citratzyklus, hier vor allem Succinat, Fumarat und Malat oder solche, die über anaplerotische Reaktionen diesem zugeführt werden können, wie zum Beispiel Laktat (Tenover et al., 1985; Stahl et al., 2012). Zusätzlich benötigen sie für ihren Stoffwechsel Eisen (Park, 2002).

2.1.2 Vorkommen und Bedeutung für Lebensmittel

Natürliche Reservoirs von *Campylobacter* spp. sind Warmblüter wie Haus- und Wildtiere, vor allem Geflügel, Rinder, Schweine und kleine Wiederkäuer (Shane, 1992), aber auch Hunde und Katzen können als Infektionsquelle für Menschen beobachtet werden (Acke, 2018).

Tabelle 2: Überblick über die 27 Spezies und acht Subspezies von *Campylobacter* spp. und ihre Wirte (modifiziert nach Ngulukun (2017))

Gattung	Wirt
<i>C. avium</i>	Geflügel
<i>C. canadensis</i>	Wildvogel
<i>C. coli</i>	Schwein
<i>C. concisus</i>	Mensch
<i>C. corcagiensis</i>	Makake
<i>C. cuniculorum</i>	Hase
<i>C. curvus</i>	Mensch
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Rind, Schaf
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Rind, Schaf
<i>C. gracilis</i>	Mensch
<i>C. helveticus</i>	Katze, Hund
<i>C. hominis</i>	Mensch
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Schwein, Rind, Mensch
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Schwein
<i>C. insulaenigrae</i>	Seehund, Schweinswal
<i>C. iqaniorum</i>	Eidechse, Schildkröte
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Mensch
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Geflügel, Rind, Schaf
<i>C. laninae</i>	Schwein
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Mensch, Krustentier
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	Möwe, Hund, Krustentier
<i>C. mucosalis</i>	Schwein
<i>C. peloridis</i>	Mensch, Weichtier
<i>C. rectus</i>	Mensch
<i>C. showae</i>	Mensch
<i>C. sputorum</i>	Rind, Schwein, Mensch
<i>C. subantarcticus</i>	Wildvogel
<i>C. troglodytis</i>	Schimpanse
<i>C. upsaliensis</i>	Katze, Hund, Mensch
<i>C. ureolyticus</i>	Mensch
<i>C. volucris</i>	Wildvogel, Mensch

In Tabelle 2 sind die *Campylobacter* spp. mit Subspezies und ihre Wirte aufgelistet. Tabelle 3 informiert über den Anteil positiver Proben auf *Campylobacter* spp. in einer Studie der

Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit EFSA (EFSA, 2018). Die Proben stammen zum einen von Masthähnchen, Schweinen und Rindern, zum anderen von Haushunden und -katzen (EFSA, 2019). In der Studie wurde eine bestimmte Anzahl (n) an Stichproben bei ausgewählten Tierarten untersucht. Eine ältere Studie von Skirrow (1981) ergab, dass der größte Anteil positiver Proben auf Hunde und Katzen zurückführbar ist. Unter den Nutztieren weisen Masthähnchen die höchste Prävalenz von *Campylobacter* spp. auf. Schweine, Rinder und kleine Wiederkäuer waren demgegenüber deutlich weniger belastet.

Tabelle 3: Übersicht ausgewählter Tierarten und die Anzahl an positiven Proben für *Campylobacter* spp. (EFSA, 2018)

Tierart	n in der EU	Anteil positiver Proben
Masthähnchen	7.441	37,5 %
Schwein	516	5,8 %
Rind	589	0,5 %
Hund und Katze	861	38,1 %

Im Vergleich zu anderen Nutztieren kommen *Campylobacter* spp. bei Geflügel am häufigsten vor (Nadeau et al., 2002). Diese Tierart hat eine Körpertemperatur zwischen 39 und 42 °C (Prinzinger et al., 1991) und liegt in der bevorzugten Wachstumstemperatur der thermophilen *Campylobacter* spp. Die thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* sind an die Därme von Vögeln adaptiert (Ketley, 1997; Park, 2002). Die Bedingungen unterschiedlicher Haltungsformen können die Existenz von *Campylobacter* spp. beeinflussen. Das Vorkommen ist saisonabhängig, da die Anzahl der Bakterien in den Sommermonaten zunimmt (Wallace et al., 1997; Rosner, 2017; EFSA, 2019). Bei Geflügel wurde *C. jejuni* am häufigsten nachgewiesen (Glünder und Weber, 2000). In der Literatur werden *Campylobacter* spp. als Kommensale der Darmmikrobiota des Geflügels angesehen. Sie lösen in der Regel keine Erkrankung bei diesem Wirt aus (Park, 2002). Neue Untersuchungen haben aber gezeigt, dass auch beim Geflügel die Belastung mit *Campylobacter* spp. dazu führen kann, dass diese in die Darmzellen eindringen und extra-intestinale Infektionen anderer innerer Organe, vor allem der Leber, und der Muskeln verursachen. Die Gesundheit, das Wohlergehen und die Leistung der Vögel werden dadurch beeinträchtigt (Williams et al., 2016). Die Frage nach dem Infektionsweg wurde schon in mehreren Studien untersucht. Diese beziehen sich auf eine horizontale Übertragung durch das Tränkwasser, die Einstreu, Insekten, Schädlinge, freilebende Vögel oder Menschen (Shane, 1992; Pearson et al., 1993).

Die enorme Belastung von Geflügelbetrieben mit thermophilen *Campylobacter* spp. führt zu einer Verbreitung in die aus dem Fleisch produzierten Lebensmittel (Skarp et al., 2016). Die EFSA schätze in einem Gutachten, dass von möglichen Infektionsquellen mit hoher Sicherheit 24,2 % auf Hühnerfleisch zurückzuführen sind (EFSA, 2018).

Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Geflügel liegt in der EU zwischen 0,0–12,3 % (EFSA, 2018). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die Durchseuchung hauptsächlich in der Aufzucht stattfindet (EFSA, 2011; Lawes et al., 2012; Agunos et al., 2014). Der Transport zum Schlachthof scheint geringe Auswirkungen auf die Kontamination zu haben, der Prozess des Schlachtens hingegen die größte, hier insbesondere das Rupfen und das Ausweiden (Skarp et al., 2016).

Ein weiteres Lebensmittel, das als Infektionsquelle für die Campylobakteriose beschrieben wird, ist das Fleisch von Schweinen und Rindern. Bei Schweinen wurde *C. coli* am häufigsten nachgewiesen (Alter et al., 2005). Er gilt als physiologischer Kommensale der Intestinalmikrobiota. Andere Autoren geben aber auch *C. jejuni* als Spezies bei Schweinen an (Harvey et al., 1999). Das gleichzeitige Vorkommen beider Spezies wird ebenfalls beschrieben (Madden et al., 2000; Boes et al., 2005). Bei Rindern können verschiedene Spezies nachgewiesen werden, zum Beispiel *C. jejuni*, *C. hyointestinalis*, *C. fetus* und *C. sputorum*. Vereinzelt wurden auch mehrere Spezies zusammen nachgewiesen. Diese Tierart kann zum einen über kontaminiertes Fleisch eine Infektion auslösen, zusätzlich kommen zum anderen, wie bereits erwähnt, auch rohe Milch und rohe Milchprodukte in Betracht. Diese Lebensmittel werden mit 54,5 % am häufigsten als zurückverfolgbare Ursache einer Campylobakteriose beim Menschen angegeben (EFSA, 2018). Allerdings stellte die EFSA fest, dass 2018 weniger als 1 % der Milchproben mit *C. jejuni* kontaminiert waren (EFSA, 2019). Diese kommen vorwiegend durch Verunreinigung über den Kot und unsauberes Melken zustande (Porter und Reid, 1980; Beumer et al., 1988; Wesley et al., 2000). Da *Campylobacter* spp. beim Pasteurisieren abgetötet werden, handelt es sich demnach um Rohmilchprodukte (Humphrey et al., 2007).

Im Gegensatz zu anderen lebensmittel-assoziierten Bakterien, wie etwa *Listeria* und *Salmonella*, sind *Campylobacter* spp. nicht in der Lage, sich außerhalb des Wirtsorganismus zu vermehren (Blankenship und Craven, 1982; Hazeleger et al., 1998; Park, 2002; Jacobs-Reitsma et al., 2008). *Salmonella* spp. können Tage bis Wochen, im Extremfall sogar Jahre, überleben

und sich dabei unter geeigneten Bedingungen sogar vermehren (Böhm, 1993; Gareis, 1995). Die Kombination aus dem mikroaerophilen Wachstum und der benötigten Temperatur bedingt bei *Campylobacter* spp. jedoch, dass eine Vermehrung außerhalb des Wirtsorganismus nicht möglich ist (Park, 2002). Da *Campylobacter* spp. ein fakultativ intrazellulärer Keim ist, besitzt er keine Lebens- und Vermehrungsfähigkeit auf Oberflächen oder in Lebensmitteln.

2.1.3 Vorkommen auf Eiern

Zur Belastung der Schale von Hühnereiern mit *Campylobacter* spp. liegen bereits einige Studien vor (Tabelle 4). Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. auf Eierschalen lag bei 0–16,8 %. Diese besitzt keinen Zusammenhang mit der Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Legehennen, wie ein Vergleich der jeweiligen Zahlen in Tabelle 4 zeigt.

Tabelle 4: Prävalenzen von *Campylobacter* spp. bei Legehennen und Eiern (modifiziert nach Alter (2018))

Land	Prävalenz in Legehennen	Prävalenz auf Eischalen	Prävalenz im Eiinhalt	Referenz
Australien	74,0 %	1,1 % (2/187)	k. l.	Shanker et al. (1986)
Brasilien	17,8 % (25/140)	0,0 % (0/244)	0,0 % (0/244)	Fonseca et al. (2006)
Deutschland	32,8 % (262/799)	0,5 % (4/800)	k. l.	Schwaiger et al. (2008)
Deutschland	k. l.	4,1 % (11/271)	0,0 % (0/271)*	Messelhäusser et al. (2011)
Finnland	5–98 % (n=642)	0,3 % (1/360)	0,0 % (0/360)*	Sulonen et al. (2007)
Iran	k. l.	7,0 % (7/100)	2–4 % [#]	Jonaidi-Jafari et al. (2016)
Polen	k. l.	5,8 % (7/120)	k. l.	Gondek et al. (2013)
Saudi-Arabien	k. l.	2,2 % (1/45)	0,0 % (0/45)	Bahobail et al. (2012)
UK	k. l.	k. l.	0,0 % (0/200) [#]	Widdicombe et al. (2009)
USA	23,3 % (14/60)	16,8 % (59/352)	k. l.	Parisi et al. (2015)
USA	k. l.	4,0 %	k. l.	Jones et al. (2016)

*Eidotter [#]Eiklar k.l. = keine Information

In einer in Deutschland zwischen 2009 und 2010 durchgeführten Studie wurden 2.710 Eierschalen aus Supermärkten bzw. Hofläden mittels kulturellem und molekularbiologischem Nachweisverfahren beprobt. 45 % der Eier stammten von Legehennen aus der Bodenhaltung, 18 % von Legehennen aus der Freilandhaltung, 21 % von Legehennen aus der Batteriehaltung und 16 % wurden direkt von Bauernhöfen bezogen. Davon wurden 4,1 % der Proben von Eierschalen positiv auf *Campylobacter* spp. getestet (Messelhauser et

al., 2011). In einer anderen Untersuchung von 2018 wurde die Kontaminationsrate von Eierschalen mit *Campylobacter* spp. mit 0,3–4,0 % angegeben (BfR, 2018).

Da der Keim sich in den Darmzellen befindet und mit dem Kot ausgeschieden wird, könnten Hühnereier über fäkale Ausscheidungen von Legehennen kontaminiert werden. Nach einem Bericht des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) waren im Jahr 2009 ca. 41,8 % der Kotproben von Legehennen positiv für *C. jejuni* (BVL, 2009). Eine andere Studie zeigt, dass bei knapp 700 untersuchten Kotproben die Belastung mit *C. jejuni* im Herbst bei 84 % und im Frühjahr bei 76 % lag (Sulonen et al., 2007). Eine weitere Analyse geht dagegen von einer Inzidenz der Ausscheider von *C. jejuni* von 12–62 % aus (Shane et al., 1986). Am häufigsten wird *Campylobacter* spp. aus den Caeca isoliert. Es ist allerdings möglich, dass andere Organe wie der Reproduktionstrakt, die Milz oder die Gallenblase kolonisiert werden. Die Kolonisation verläuft in der Regel ohne systemische Erkrankung des Tieres ab (Cox et al., 2009).

Im Eiinhalt wurden nur sehr selten *Campylobacter* spp. nachgewiesen, es ist aber nicht auszuschließen, dass dieser *Campylobacter* spp. enthalten kann (siehe Tabelle 4). Eine vertikale Übertragung vom Huhn in das Eiinnere wird dabei in der Literatur für sehr unwahrscheinlich gehalten (Pearson et al., 1993; Chuma et al., 1997; Gregory et al., 1997; Sahin et al., 2003). Die Kontamination findet nach dem Legen des Eis statt. *Campylobacter* spp. haben eine geringe Stresstoleranz gegenüber Austrocknung und sind nicht in der Lage länger als 16 Stunden auf der Eioberfläche zu überleben (Shane et al., 1986; Allen und Griffiths, 2001).

In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass es einen sehr schnellen Abfall der Anzahl lebender *Campylobacter* spp. auf der Eierschale gibt. In Abhängigkeit von der Lagertemperatur, die zwischen 4 °C und 42 °C lag, konnte spätestens nach 18 Stunden kein kultureller Nachweis mehr erbracht werden (Izat und Gardner, 1988). Die Zeit zwischen dem Legen des Eis und der Verarbeitung beim Verbraucher liegt deutlich über diesen Werten. Wenn die Eioberfläche verschmutzt ist, kann dies zu günstigeren Bedingungen für *Campylobacter* spp. führen. Die genannten Studien erbringen einen kulturellen Nachweis von *Campylobacter* spp. und keinen molekularbiologischen (vgl. hierzu auch Abschnitt 2.1.4 zum VBNC-Status).

Einige wenige Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass *Campylobacter* spp. durch die Eierschale dringen können. So wurden bei zwei von 48 Proben (4,2 %) *Campylobacter* spp. im

Eiinneren gefunden (Allen und Griffiths, 2001). Risse oder eine dünne Schale begünstigen die Penetration der Eierschale.

Die Fähigkeit der *Campylobacter* spp. durch die Eierschale in den Eihalt zu gelangen, wurde unter anderem unter dem Aspekt der Temperaturdifferenz untersucht (Clark und Bueschkens, 1985). Diese Untersuchung basiert auf der Annahme, ein warmes, frisch gelegtes Ei ziehe sich beim Abkühlen durch die Umgebungstemperatur zusammen. Dadurch kommt es zu einem Unterdruck, der möglicherweise die Bakterien durch die Eierschale ziehen kann. Die Untersuchungsergebnisse dieser Studie implizieren allerdings, dass keine Übertragung stattfindet.

Auch eine Studie aus dem Jahr 1986 zeigt, dass nach künstlicher Kontamination der Eierschale ($n = 257$) mit *Campylobacter* spp. keine Penetration in den Eihalt stattfindet (Shanker et al., 1986). Paula et al. (2009) haben zusätzlich festgestellt, dass *C. jejuni* im Eiinneren nicht überleben und sich dort auch nicht vermehren können.

2.1.4 Viable But Non-Culturable (VBNC)

Bei ungünstigen Lebensbedingungen können *Campylobacter* spp. in einen Zustand wechseln, in dem sie noch lebensfähig sind, sich aber nicht mehr kultivieren lassen. Dieser Zustand wird als „lebensfähig, aber nicht kultivierbar“ („Viable But Non-Culturable“, VBNC) bezeichnet (Lv et al., 2019). Beim VBNC-Status handelt es sich daher um einen Lebendzustand, in dem die Keime metabolisch und physiologisch aktiv sind, aber nicht auf Nährmedien angezüchtet werden können (Bogosian und Bourneuf, 2001).

Die meisten der Bakterien, die in den VBNC-Status eintreten, sind gramnegative Arten, die zur Gamma-Unterklasse der *Proteobacteria* gehören. Der Status kommt aber auch bei *Rhizobium*, *Agrobacterium* und *Helicobacter-Campylobacter*-Arten vor (Oliver, 2000). Die Ursache dafür, dass diese Bakterien in den VBNC-Status eintreten, sind schwierige Umweltbedingungen wie Mangelernährung (Cook und Bolster, 2007), extreme Temperaturen (Besnard et al., 2002), osmotischer Stress (Asakura et al., 2008), mangelnde Verfügbarkeit von Sauerstoff (Mascher et al., 2000), Änderungen des pH-Wertes oder des Salzgehaltes (Cunningham et al., 2009), Beleuchtung mit weißem Licht (Gourmelon et al., 1994) sowie Dekontaminierungsverfahren wie die Pasteurisierung von Milch und die Chlorierung von Abwasser (Oliver, 2005).

Vegetative Bakterien nehmen, wenn sie geschwächt sind, ihr Wachstum wieder auf, sobald geeignete Nährstoffe und Bedingungen zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu lassen sich Bakterien im VBNC-Status nicht kultivieren, auch wenn Nährstoffe zugeführt werden und die geeignete Umgebung geschaffen wird (Nyström, 2001). Dennoch weisen sie Merkmale eines aktiven Metabolismus auf, wie zum Beispiel Atmung, Fermentation, Aufnahme radioaktiver Substrate und Proteinsynthese (Fakruddin et al., 2013). Dabei behalten die Bakterien ihre Zellintegrität, zeigen aber eine reduzierte Stoffwechselaktivität (Oliver, 2005) und Veränderungen im Proteinprofil der Außenmembran (Muela et al., 2008). Darüber hinaus weisen sie eine kontinuierliche Genexpression auf (Maalej et al., 2004) und reagieren durch spezifische Expression von Genen auf äußere Reize (Kell et al., 1998). Sie enthalten einen hohen ATP-Spiegel und ein hohes Membranpotential (Signoretto et al., 2000).

Unter bestimmten Laborkulturbedingungen oder mit speziellen Methoden können die VBNC-Organismen wieder zum Wachstum angeregt werden (Yamamoto, 2000) und die Fähigkeit zur Kultivierbarkeit wiedererlangen (Anuchin et al., 2009). Ein Nachweis, ob Bakterien im VBNC-Status vorliegen, kann zum Beispiel erbracht werden, indem die Anzahl der anzüchtbaren Kolonien mit einer direkten Färbung der toten bzw. lebenden Zellen und anschließenden Auszählung verglichen wird (Sachidanandham und Yew-Hoong Gin, 2009).

Trotz dieser Unterschiede zwischen den kultivierbaren und nicht kultivierbaren Stadien besitzen Bakterien im VBNC-Status ein infektiöses Potenzial (Cappelier et al., 2007). Insbesondere wenn sie in den Magen-Darm-Trakt eines Wirtes gelangen, gewinnen zahlreiche VBNC-Bakterien ihre Kultivierbarkeit und Vermehrungsfähigkeit zurück (Colwell et al., 1996). Über die Wiederaufnahme der metabolischen Aktivitäten sind sie dann wieder in der Lage Krankheiten zu übertragen (Baffone et al., 2003; Amel et al., 2008). Zusätzlich gilt auch eine erhöhte Antibiotikaresistenz aufgrund der geringeren metabolischen Aktivität während des VBNC-Status als problematisch (Oliver, 2010). Mehrere Studien belegen das Vorkommen von VBNC-Bakterien in Lebensmitteln (Ordax et al., 2009), zum Beispiel *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium in gefrorenem und pasteurisiertem Grapefruitsaft (Nicolò et al., 2011), *E. coli* und *Pseudomonas putida* in pasteurisierter Milch (Gunasekera et al., 2002) sowie Essig- und Milchsäurebakterien in Wein (Millet und Lonvaud-Funel, 2000).

Auch *Campylobacter* spp. sind in der Lage einen VBNC-Status auszubilden. Bei suboptimalen Umweltbedingungen sind die Bakterien fähig, sich in eine kokkoide Degenerationsform

umzuwandeln. So sind sie zwar noch lebensfähig, aber nicht mehr kulturell anzüchtbar (Blackburn und McClure, 2009). In welchem Ausmaß sie in diesem Stadium noch infektiös sind, wird kontrovers diskutiert. Die Erstbeschreiber des VBNC-Status von *Campylobacter* spp. kamen zu der Erkenntnis, dass es zu einer Rückwandlung der Spiralform im Darm des Wirtes kommen kann (Rollins und Colwell, 1986). Die Möglichkeit der erneuten Rückwandlung hängt allerdings von dem jeweiligen Stamm ab und ist nicht immer gleich gut möglich (Murphy et al., 2006).

2.1.5 Zoonotisches Potential und Pathogenese beim Menschen

Die Campylobakteriose des Menschen ist weltweit verbreitet. Es handelt sich mittlerweile um die häufigste bakteriell bedingte Gastroenteritis in Europa (EFSA, 2018). Seit 2001 ist sie in Deutschland gemäß § 34 Abs. 6 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) meldepflichtig. Im Jahr 2005 lag dem RKI zufolge die Zahl der durch *Campylobacter* spp. ausgelösten gastrointestinalen Erkrankungen zum ersten Mal über der Zahl der durch Salmonellen ausgelösten (RKI, 2006). Wie in Abschnitt 2.1.2 dargestellt, ist Hühnerfleisch am häufigsten mit *Campylobacter* spp. belastet. Aber auch Rinder- und Schweinefleisch kommen als Überträger der Campylobakteriose infrage. Am häufigsten wird die Erkrankung der Gastroenteritis über *C. jejuni* und *C. coli* ausgelöst, wobei *C. jejuni* mit über 90 % die meisten Fälle auslöst (Bolinger und Kathariou, 2017). Die infektiöse Dosis liegt bei 500–800 Bakterien (Robinson, 1981; Black et al., 1988).

Die Campylobakteriose ist in der Regel nach einer Woche selbstlimitierend (Ketley, 1997). Die Symptome sind unterschiedlich und vielfältig. Eine Infektion beginnt bei etwa der Hälfte der Patienten mit einem Anfangsstadium, das durch akute Bauchschmerzen, Fieber und allgemeines Unwohlsein gekennzeichnet ist. Im Anschluss daran folgt Durchfall. Die Diarrhöe kann dabei mild (nicht-entzündliche, wässrige Diarrhoe) bis schwer (entzündliche Form) verlaufen (Butzler und Skirrow, 1979). Als Inkubationszeit wird ein Zeitraum von einem bis sieben Tagen angegeben, wobei die genaue Erfassung häufig sehr schwierig ist (Ketley, 1997).

Für das Auslösen einer Campylobakteriose verfügt *C. jejuni* über verschiedene Mechanismen, damit er bei den ungünstigen Bedingungen während der Passage des Gastro-Intestinal-Traktes, überleben kann. *C. jejuni* bildet das „cytolethale distending toxin“ (CDT) aus, welches sich aus drei unterschiedlichen Einheiten zusammensetzt. Die CdtA-Einheit besteht aus 807

bp, die CdtB-Einheit aus 781 bp und die CdtC-Einheit aus 570 bp (Méndez-Olvera et al., 2016). Die CdtA- und die CdtC-Einheit sorgen dafür, dass das Toxin in die Wirtszelle gelangen kann, wo es über eine DNase-Aktivität der CdtB-Einheit zu DNA-Strangbrüchen führt und damit eine Blockade des Zellzyklus bewirkt (Lara-Tejero und Galán, 2002; Hassane et al., 2003; Ge et al., 2008).

Um das Immunsystem des Wirtstieres zu umgehen, ist *C. jejuni* mit einer Kapsel umgeben. Diese sorgt gleichzeitig dafür, dass eine Antikörperbindung nicht möglich ist (Bacon et al., 2001; Champion et al., 2010; Maue et al., 2013). Ein weiterer Virulenzfaktor von *C. jejuni* sind die Lipopolysaccharide, die in der äußeren Membran variabel vorkommen. Diese haben verschiedene Funktionen wie zum Beispiel Wachstum, die mögliche Ausbildung einer Antibiotikaresistenz und Zellinvasion (Marsden et al., 2009). Einige Stämme von *C. jejuni* sind fähig, Hämolyse zu bilden, welche die Wirtszelle direkt zerstören können. Durch die Lyse von Erythrozyten, die der Hauptspeicher des Eisens sind, wird dadurch die Eisenaufnahme des Bakteriums möglich (Hossain et al., 1993).

Eine weitere postinfektiöse Komplikation einer Campylobakteriose stellt die reaktive Arthritis dar, deren Häufigkeit bei 0,9 % liegt (Ajene et al., 2013).

In sehr seltenen Fällen (unter 0,1 %, Ropper (1992)) kann es zu einer Folgeerkrankung durch *Campylobacter* spp. kommen, dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS). Dieses Syndrom kann nicht ausschließlich durch *Campylobacter* spp. ausgelöst werden, jedoch gilt *C. jejuni* als eine häufige Ursache (van Doorn et al., 2008). Der genaue pathologische Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer molekularen Mimikry zwischen sialylierten (Derivate der Neuraminsäure) Lipooligosaccharid-Strukturen auf der Zellhülle des Bakteriums und Gangliosid-Epitopen auf den menschlichen Nerven. Es kommt zu einer Entzündung der Myelinscheiden von Nervenwurzeln des Rückenmarks. Diese Entzündung ruft eine Entmarkung der peripheren Nerven hervor, die darin resultiert, dass Nervenimpulse immer schwächer weitergeleitet werden (Nyati und Nyati, 2013). Das Krankheitsbild zeigt sich folglich in einer aufsteigenden schlaffen Lähmung. Eine zusätzliche Beteiligung der Hirnnerven kann die Aufrechterhaltung der Atemwege, die Gesichtsmuskeln, die Augenbewegungen und das Schlucken beeinträchtigen. Etwa 30 % der Patienten müssen im Laufe der Erkrankung beatmet werden (Hahn, 1998). Die Mortalität des GBS beträgt ca. 3 % (van den Berg et al., 2013).

2.2 Nachweis und Bestätigung von *Campylobacter* spp.

2.2.1 Kultureller Nachweis

Bei der Gattung *Campylobacter* handelt es sich um anspruchsvolle Bakterien. Bei niedrigen Keimzahlen werden die Proben zunächst angereichert (ISO 10272, 2017). Um andere Bakterien als Begleitmikrobiota zu unterdrücken, sind den Anreicherungsbouillons verschiedene Antibiotika zugegeben. Hierzu zählt unter anderen Vancomycin, das für die Hemmung des Wachstums grampositiver Kokken hinzugefügt wird (Donnison, 2003). Außerdem eignen sich Trimethoprim und Cephalosporine für die Unterdrückung von *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden (Donnison, 2003). Zusätzlich können mittels Amphotericin B Hefen und Pilze in ihrem Wachstum gehemmt werden (Bolton und Robertson, 1982; Goossens et al., 1986).

Die Anreicherungsbouillons werden für 48 Stunden bei 41,5 °C unter mikroaerophiler Umgebung (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂) bebrütet (Mansfield und Abner, 2000). Nach dieser Zeit können sie auf feste Nährmedien überführt werden. Infrage kommen hier entweder Selektivnährböden, wie der Karmali-Agar oder der modifiziertem Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCDA), oder aber nicht selektiver Blutagar (Cools et al., 2003; Alispahic et al., 2010). Die mit Anreicherungsbouillon oder direkt mit Kolonien beimpften Platten werden ebenfalls für 48 Stunden bei 41,5 °C unter mikroaerophiler Atmosphäre bebrütet. Zu der Anreicherung und der anschließenden Kultivierung thermophiler *Campylobacter* spp. steht ein international standardisiertes Verfahren zur Verfügung (ISO 10272:2017, siehe Abbildung 3).

Auf verschiedenen Festmedien wird die Koloniemorphologie beurteilt. Auf Blutplatten wachsen *Campylobacter* spp. als kleine, gräuliche, runde Kolonien, die je nach Anzahl auch überlagert sein können. Bei Nährmedien wie mCCDA, die Kohle enthalten, stellen sie sich als winzige und gräuliche Kolonien dar, die allerdings blasser sind. Thermophile *Campylobacter* spp. sind in der Regel Cytochrom-Oxidase positiv, viele Spezies davon können Nitrat zu Nitrit reduzieren sowie Katalase bilden (Hébert et al., 1982).

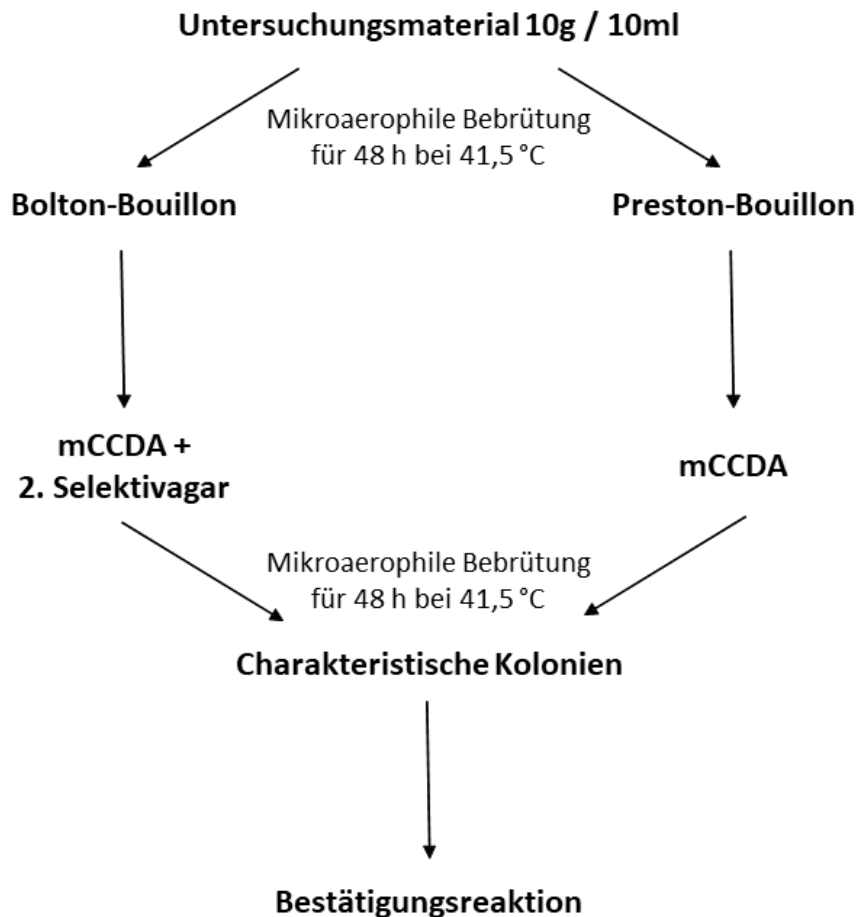


Abbildung 3: Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp. nach ISO 10272:2017

Die Katalase-Aktivität der Bakterien wird mittels Wasserstoffperoxidlösung beurteilt. Die Probe ist positiv, wenn sich innerhalb von 30 Sekunden Bläschen bilden (ISO, 2018). Die Ergebnisse werden mithilfe einer Positiv- und Negativkontrolle bestätigt. Geeignete Stämme sind zum Beispiel *Campylobacter jejuni* WDCM 00005 als positive und *Enterococcus faecalis* WDCM 00087 als negative Kontrolle (Aebi, 1974; Johansson und Borg, 1988).

Mit dem Oxidase-Test wird das Enzym Cytochromoxidase der Atmungskette von Bakterienzellen nachgewiesen. Oxidase-positive Bakterien färben das mit Oxidasereagenz befeuchtete Filterpapier nach zehn Sekunden bläulich, violett oder tiefblau (Iwata, 1998).

Um *Campylobacter* spp. zu bestätigen, kann die mikroskopische Morphologie beurteilt werden. Eine echte Beweglichkeit zeichnet sich durch eine Ortsveränderung mit Hilfe von korkenzieherartigen Bewegungen aus. Zudem ist die Beurteilung mithilfe eines hängenden Tropfens möglich (ISO, 2018).

Zur Unterscheidung der einzelnen Stämme kann eine Biotypisierung mittels der Bildung von Katalase, der Nitrat- bzw. Nitritreduktion, der Hippurathydrolyse, der Indoxylacetat-Hydrolyse

und dem unterschiedlichen Wachstum bei 25 °C und 42 °C erfolgen. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht zu den jeweiligen möglichen Reaktionen ausgewählter Spezies von thermophilen *Campylobacter* spp.

Tabelle 5: Übersicht über einige biochemische Reaktionen von thermophilen *Campylobacter* spp. (modifiziert nach Logan et al. (2000))

Stamm	Katalase	Nitrat-reduktion	Nitrit-reduktion	Hippurat-hydrolyse	Indoxyl-acetat-hydrolyse	Wachstum	
						25 °C	42 °C
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointesitinalis</i>	+	+	-	-	-	v	+
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	-	+	-
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>C. gracilis</i>	-	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>C. rectus</i>	-	+	+	-	+	-	s.R.
<i>C. upsaliensis</i>	s.R./-	+		-	+	-	+
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	-	+	-	+
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	+	-	+
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. hyolei</i>	+	+	+	-	n.b.	n.b.	v
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	+	-	-	v	+	-	-
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	+	+	-	+	+	-	+

v = variabel s.R. = schwache Reaktion += positiv -= negativ n.b.= nicht bestimmbar

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein alternatives Nachweisverfahren zur Bestimmung von thermophilen *Campylobacter* spp. bietet die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Dabei handelt es sich um eine Methode zur Amplifizierung (Vervielfältigung) von gewünschten DNA-Sequenzen durch eine DNA-Replikation, die in vitro durchgeführt wird und innerhalb weniger Stunden Ergebnisse liefert. Es lassen sich mithilfe einer PCR auch kleinste Mengen von DNA feststellen und nachweisen. PCR-basierte Methoden wurden in den letzten Jahren für den Nachweis und die Quantifizierung von thermophilen *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln, Futtermitteln, in fäkalen Proben und in Wasserproben entwickelt (Mayr et al., 2010; Bui et al., 2012; Toplak et al., 2012). Auch für eine schnelle Diagnostik von Campylobakteriosen werden PCRs eingesetzt. Dazu muss zunächst die Nukleinsäure der *Campylobacter* spp. aus dem Probenmaterial extrahiert werden.

Für die anschließende PCR werden drei unterschiedlich temperierte Schritte zyklisch wiederholt. Als erstes kommt es zur Denaturierung des DNA-Doppelstranges. Dies geschieht

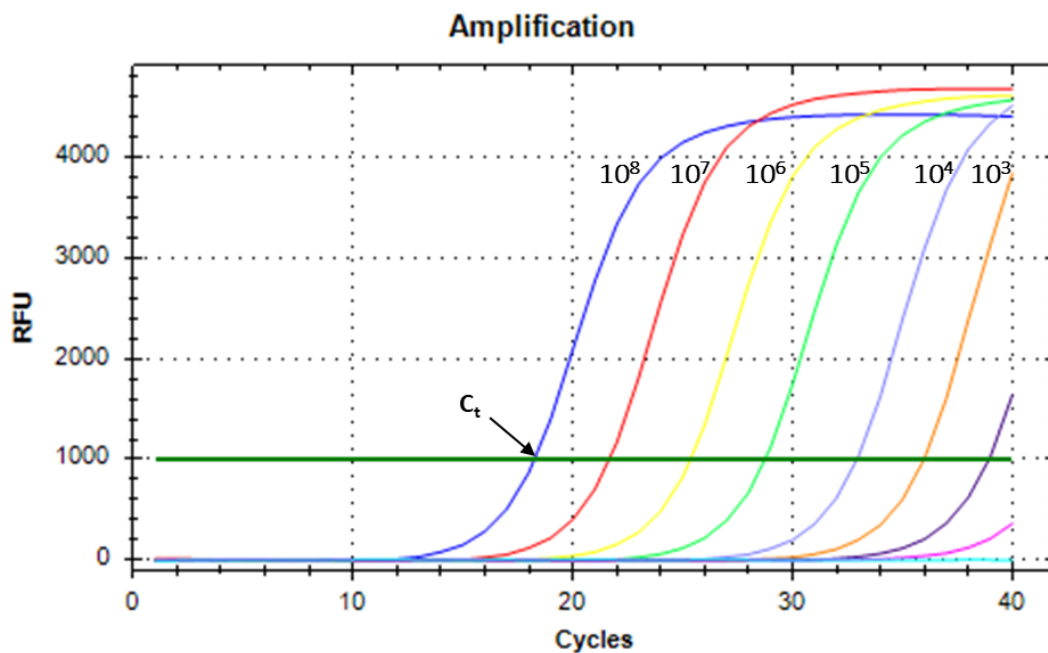
durch Erhitzen bei 95 °C. Im Anschluss liegt die DNA in ihren Einzelsträngen vor. Im nächsten Schritt müssen Primer, die als Startpunkt der DNA-Synthese dienen, an ihre jeweilige komplementäre Stelle auf der DNA angelagert werden. Dies wird als Annealing oder auch Hybridisierung bezeichnet. Die ausgewählte Temperatur hängt von der Länge der entsprechenden Primer und dem Verhältnis der Basenpaare ab. Bei diesem Schritt sollte eine Temperatur zwischen 40 °C und 70 °C eingehalten werden. Anschließend folgt die Elongation der DNA (Rassow et al., 2016). Die Neusynthese der DNA wird durch die DNA-Polymerase katalysiert, die thermostabil ist und ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt (Saiki et al., 1988). Sie muss nur einmalig zu Beginn dazu gegeben werden, da sie nicht leicht denaturiert. Die optimale Temperatur für diese hitzestabile Polymerase liegt bei 70 °C–72 °C (Rassow et al., 2016).

Mit Hilfe von real-time PCRs kann in Echtzeit das neu entstandene PCR-Produkt verfolgt werden, da ein fluoreszierender Farbstoff, z. B. SYBR Green I, hinzugefügt wird, der mit der DNA interagiert (Wittwer et al., 1997). Das Fluoreszenzsignal und das PCR-Produkt verhalten sich proportional zueinander (Higuchi et al., 1993). Bei jedem Zyklus wird die neu hergestellte Menge der DNA detektiert und es entsteht eine Kurve, die aus mehreren charakteristischen Phasen besteht. Über den C_t -Wert (threshold cycle) kann eine Auswertung des Analyts erfolgen. Dieser Wert zeigt den ersten Punkt an, bei dem das fluoreszierende Signal über das Grundrauschen hinausgeht. Je schneller der C_t -Wert überschritten wird, desto größer ist die DNA-Menge im Anfangsmaterial. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für den Output einer real-time PCR mit verschiedenen Proben, die unterschiedliche C_t -Werte aufweisen.

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. mittels PCR wurde bereits in vielen Studien durchgeführt. Die jeweiligen Methoden weisen verschiedene Zielgene nach. Das erste Verfahren, das *C. jejuni* und *C. coli* nachweist, erkennt mittels spezifischer Primer (pg50 und pg3) das Flagellin-A-Gen (*flaA*) und wurde 1992 zum ersten Mal verwendet (Oyofe et al., 1992). Daneben gibt es noch zahlreiche andere Gene, die für die PCR-Amplifikation herangezogen werden können, zum Beispiel der 16S- oder der 23S-rRNA-Gen-Abschnitt (Eyers et al., 1993; Perelle et al., 2004) oder das *asp*, ein Gen, das für die Aspartatkinase kodiert, und somit spezifisch *C. coli* nachweist (Linton et al., 1997).

Die PCR ermöglicht keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien, da sie in beiden Fällen die vorhandene DNA vervielfältigt. Zur Typisierung der Isolate nach dem

Ausbruch, zur Untersuchung der Verbreitung sowie zur Einschätzung eines Zusammenhangs der *Campylobacter*-Stämme bei Tieren und Menschen ist die kulturelle Methode notwendig. Das RKI empfiehlt daher die kulturelle Anzucht als Standard-Methode zum Nachweis von *Campylobacter* spp., wobei die PCR als alternatives bzw. zusätzliches Nachweisverfahren angewendet werden kann (RKI, 2021).



RFU = Relative fluorescence units; Die festgelegte „threshold“ der Amplifikation (C_t-Wert) liegt beispielhaft bei RFU = 1000. Die Zahl der extrahierten Bakterien lag bei 10⁸ KbE/ml–10¹ KbE/ml.

Abbildung 4: Beispiel für den Output einer real-time PCR bzw. qPCR

2.2.3 MALDI-TOF MS

Ein weiteres Nachweis- und Bestätigungsverfahren ist die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Als Ausgangsmaterial wird Koloniemasse aus nicht selektiven Festmedien wie z. B. Blutagar verwendet.

Das Prinzip besteht darin, Ionen in der Gasphase zu erzeugen, aufzutrennen und zu detektieren. Um Moleküle in die Gasphase zu überführen, werden thermische Verdampfungsmethoden verwendet. Dafür wird die zu untersuchende Probe auf eine leitfähige Platte (Target) aufgetragen. Danach wird die Probe in eine kristalline Struktur von organischen Verbindungen (Matrix) eingebettet, die dafür sorgt, dass die Bakterien aus einer Probe in einem Ionengitter festgehalten werden. Im Anschluss daran wird das Target bei Raumtemperatur getrocknet (Carbannelle et al., 2011). Die Kristalle werden mit einem

Nanosekunden-Laserstrahl bestrahlt. Hierfür eignet sich zum Beispiel ultraviolettes Licht, das eine Wellenlänge von 266 nm oder 337 nm hat (Jurinke et al., 2004). Mithilfe der Energie, die dadurch erzeugt wird, werden die Bakterien verdampft und alle Moleküle, aus denen die Bakterien bestehen, herausgeschossen, wodurch eine Teilchenwolke entsteht. Dieser Prozess kann als Umwandlung von Laserenergie in Schwingungen der Kristallmoleküle beschrieben werden.

Ein elektrisches Feld beschleunigt diese Moleküle dann in eine Richtung. Je nachdem, wie groß die Moleküle sind, fliegen sie unterschiedlich schnell und erreichen daher zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen eingebauten Detektor. Jeder Peak des Spektrums spiegelt die Masse eines Partikels des Bakteriums wider. Die Ionenmassen (Masse-Ladungsverhältnisse $[m/z]$) werden typischerweise durch die Messung ihrer TOF berechnet (Jurinke et al., 2004; Carbonnelle et al., 2011). Unter der Voraussetzung, dass die Anfangsenergie bei allen Molekülen identisch ist, ist die TOF bei schwereren Molekülen länger als bei leichteren (Jurinke et al., 2004). Daraus ergibt sich für jede Bakterienart ein individueller molekularer „Fingerabdruck“, das Massenspektrum. Die Kolonie wird mittels MALDI-TOF MS identifiziert, indem deren Spektren mit Referenzspektren von bekannten *Campylobacter*-Stämmen verglichen werden (Lay Jr, 2001). Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über das Verfahren.

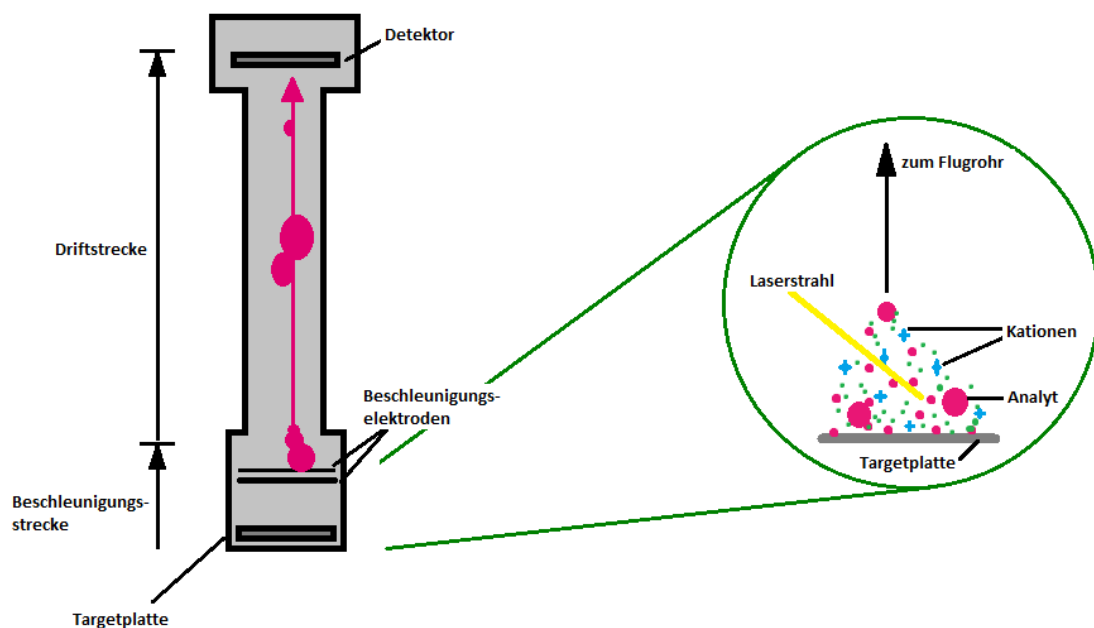


Abbildung 5: Schematische Darstellung des MALDI-TOF MS (verändert nach Burak und Gehrt (2010))

2.3 Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien

2.3.1 Messung der metabolischen Aktivität

Die metabolische Aktivität eines Bakteriums kann über dessen respiratorische Aktivität bestimmt werden. In Verbindung mit der Durchflusszytometrie kann unter anderem 5-cyano-2,3-di-4-tolyltetrazoliumchlorid (CTC) verwendet werden (Kaprelyants und Kell, 1993). Dies ist ein nicht fluoreszierendes, wasserunlösliches Kristall, das von Bakterien in der Atmungskette reduziert wird. Dadurch wird es zum fluoreszierenden, wasserlöslichen CTF (Formazan-Form von CTC) reduziert (Rodriguez et al., 1992). Das Fluoreszenzsignal wird ausgewertet und dient somit der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 Nachweis von mRNA

Die verschiedenen RNAs haben unterschiedliche Funktionen. Die mRNA kodiert die Proteine und wird für diagnostische Zwecke genutzt (Rassow et al., 2016). Da die toten Bakterien keine Aktivität mehr haben, benötigen sie keine mRNA. Daher wird nach dem Tod der Zelle die mRNA abgebaut, so dass der mRNA-Gehalt zur Beurteilung der Aktivität der Zelle und damit zur Lebend-Tot-Differenzierung verwendet werden kann (Keer und Birch, 2003). Zum Nachweis des Vorhandenseins der mRNA wird die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) angewendet. Hierbei wird RNA in DNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus der RNA eine Complementary DNA (cDNA) transkribieren kann (Rassow et al., 2016). Im Anschluss wird die umgeschriebene cDNA mittels PCR-Amplifikation vermehrt. Neben den Komponenten wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, wird ein spezifisches Primerpaar für Zielkeime benötigt (Rassow et al., 2016).

Allerdings sind mRNAs nicht sehr stabil, da sie in einem kurzen Zeitraum von den RNasen abgebaut werden (Rassow et al., 2016). Außerdem kann bei sehr langsam wachsenden Bakterien die Menge des zu erfassenden mRNA-Gehalts so niedrig sein, dass dieser nicht erfasst werden kann. So ist es leicht möglich, falsch negative Werte zu erhalten. Ebenso ist es umgekehrt möglich, dass sich die mRNA vieler toter Bakterien aufsummiert und so zu falsch positiven Werten führen kann (Kobayashi et al., 2009).

2.3.2.2 Nachweis der Membranintegrität

Tote Zellen besitzen keine Aktivität mehr und verlieren ihre Membranintegrität. Es besteht daher die Möglichkeit, anhand der Unversehrtheit der Zellmembran lebenden von toten Zellen zu unterscheiden (Keer und Birch, 2003).

Möglich ist hierbei die Verwendung von Ethidiummonoazid (EMA) oder Propidiummonoazid (PMA). In beiden Fällen wird ausgenutzt, dass die Zellmembran bei toten Bakterien nicht mehr intakt ist. Bei den beiden Substanzen handelt es sich um Farbstoffe, die durch die beschädigte Membran in die Zelle eindringen können. In der Zelle können sie irreversibel an die DNA binden (Wagner et al., 2015). Ihre photoinduzierbare Azidgruppe ermöglicht eine kovalente Quervernetzung von PMA (und auch EMA) durch Exposition in hellem Licht z. B. von einer Halogenlampe oder durch den Glo-Plate™ Blue LED Illuminator von Biotium, eine Lichtbox, die für die Photolyse verwendet werden kann. Dieser Prozess sorgt dafür, dass die DNA unlöslich wird und infolgedessen eine Beschädigung der DNA auftritt. Dadurch ist in einer anschließenden PCR die DNA nicht mehr zugänglich und kann nicht mehr vervielfältigt werden.

In Abbildung 6 ist dies veranschaulicht. Im Vergleich der beiden Substanzen sollte PMA bevorzugt angewandt werden, weil EMA auch durch die Zellwand lebender Zellen dringen kann und somit auch die DNA-Replikation lebender Zellen während der PCR inhibiert (Nocker et al., 2006). Eine präzise Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wird dadurch ermöglicht.

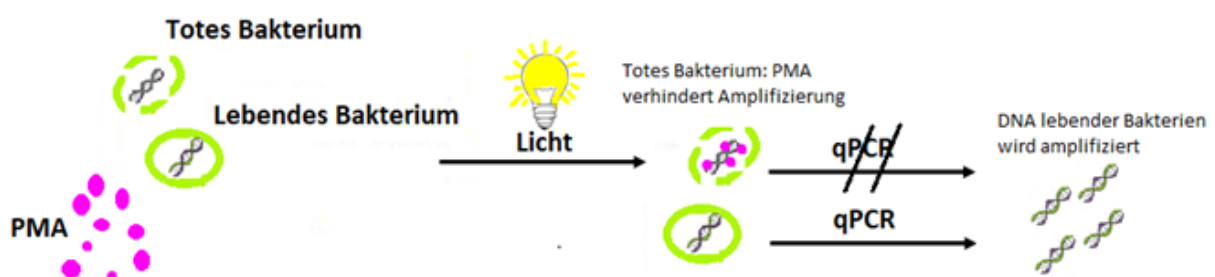


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PMA-Behandlung

Die Behandlung mit PMA/EMA eignet sich für den Nachweis von Mikroorganismen, insbesondere lebensmittel-assoziierte Krankheitserreger, deren Anzucht zeitaufwändig und

schwierig ist, wie zum Beispiel *Campylobacter* (Park, 2002), *Salmonella* (Meyer, 2015), *Listeria monocytogenes* (RKI, 2006) und der *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (Dorn-In et al., 2019). Durch die gezielte Vervielfältigung der DNA von lebenden Bakterien in der Probe werden falsch negative Ergebnisse verhindert, die dadurch entstehen, dass die kulturelle Anzucht dieser Bakterien schwierig ist. Auch deswegen wurden Methoden der Probenbehandlung mit PMA/EMA (Pacholewicz et al., 2013; Lv et al., 2019) und der anschließenden PCR, qPCR oder RT-PCR entwickelt (Best et al., 2003; Botteldoorn et al., 2008; Rodgers et al., 2012; Toplak et al., 2012). Darüber hinaus wendeten einige Studien die PMA/EMA-Vorbehandlung mit anschließender PCR an, um Bakterien im VBNC-Status zu detektieren (Rudi et al., 2005; Nocker et al., 2006; Chang et al., 2010; He und Chen, 2010; Josefsen et al., 2010).

3 Material

3.1 Eierproben

3.1.1 SPF-Eier

Die in dieser Arbeit verwendeten Eier stammen aus der SPF-Haltung der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der LMU München. Die Eier wurden bis zur Verwendung bei +5,5 °C gelagert.

3.1.2 Eier aus dem Handel

Zur Untersuchung der Prävalenz von *Campylobacter* spp. bei Eiern aus dem Handel wurden im April 2020 insgesamt 30 Packungen von Eiern verschiedener Chargen und Hersteller in Supermärkten in Süddeutschland erworben (siehe Tabelle 6). Die Proben wurden nach dem Erwerb bis zur Untersuchung (maximal eine Woche) bei +5,5 °C gelagert.

Tabelle 6: Übersicht über die im Handel erworbenen Eierproben

Haltungsform	Betrieb	Gewicht	Erzeugercode	Erworben
Öko 1	Brandlhof	L	0-DE-0917872	Edeka
Öko 2	Die Biohennen	XL	0-DE-0947871	Edeka
Öko 3	BioOrganic	M	0-NL-4403201	Lidl
Öko 4	Bio	M	0-DE-1301851	Lidl
Öko 5	Bergland-Ei	M	0-DE-0930132	Hit
Öko 6	HennenGockelEi	M	0-DE-0978951	Hit
Öko 7	Naturgut	L	0-DE-0350111	Penny
Öko 8	Eifrisch	L	0-DE-0357151	Penny
Öko 9	KauflandBio	L	0-DE-0358491	Kaufland
Öko 10	Bioland	L	0-DE-0818051	Kaufland
Freiland 1	Unser Bayern	M	1-DE-0922892	Aldi
Freiland 2	Landvogt	M	1-NL-4192805	Aldi
Freiland 3	Ertl Eier	M	1-DE-0921633	REWE
Freiland 4	Sonnendorfer	M	1-DE-0921654	Lidl
Freiland 5	Heinrich Goertz	L	1-DE-0980004	Hit
Freiland 6	Thanninger Freiheit	L	1-DE-0920025	Edeka
Freiland 7	Obermeier Frischeier	M	1-DE-0930472	Edeka
Freiland 8	Columbus	S	1-DE-1301911	Penny
Freiland 9	FARM EI	L	1-DE-1500311	Kaufland
Freiland 10	Kwetters Eierhof	XL	1-DE-1500307	Kaufland

Tabelle 6: Übersicht über die im Handel erworbenen Eierproben (Fortsetzung)

Haltungsform	Betrieb	Gewicht	Erzeugercode	Erworben
Boden 1	Südei Vermarktung GmbH	M	2-DE-0530532	Lidl
Boden 2	Bavaria Ei	M	2-NL-4072501	Lidl
Boden 3	Ja!	M	2-DE-0935232	REWE
Boden 4	Vom Land	M	2-DE-1500202	Netto
Boden 5	Ertl's	L	2-DE-0921632	REWE
Boden 7	Regina	XL	2-DE-0932912	Hit
Boden 8	Herzbube	L	2-DE-0523056	Penny
Boden 9	Zeeb's	M	2-DE-0805237	Kaufland
Boden 10	Tilman Grauer	M	2-DE-0804953	Kaufland

3.2 Mikrobiologische Materialien

3.2.1 Referenzstamm

Als Referenzstamm wurde *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* DSM 4688 verwendet, der bis zu den Untersuchungen bei -80 °C gelagert wurde.

3.2.2 Nährmedien

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Nährmedien verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Nährmedien mit Angaben zur Herstellung

Nährmedien	Herstellung	Produzent	Artikelnr.
Blutagarplatten	Columbia Agar mit Schafblut, gebrauchsfertig	VWR International GmbH, Deutschland	100253ZF
<i>Campylobacter</i> mCCDA	gebrauchsfertig	VWR International GmbH, Deutschland	100191ZF
Plate Count Agar (PC)	22,5 g PC-Agar ad 1 l Aqua dest. A: 15 min., 121 °C	Merck KGaA, Deutschland	1054630500

3.2.3 Verbrauchsmaterial

Für die Versuche wurden die in Tabelle 8 dargestellten Verbrauchsmaterialien verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen

Verbrauchsmaterial	Produzent	Artikelnr.
0,85 %ige NaCl-Lösung	Merck KGaA, Deutschland	1.106404.1000
15 ml- Reaktionsgefäß	Greiner BIO-ONE	188271
2-Propanol	Merck KGaA, Deutschland	109634
50 ml- Reaktionsgefäß	Greiner BIO-ONE	227261
Anaerobentopf 2,5 l Volumen	VWR International GmbH, Deutschland	1.16387.0001
AnaeroGen 2,5 l	Oxoid Deutschland GmbH, Deutschland	AN0025A
AnaeroGen Compact	Oxoid Deutschland GmbH, Deutschland	AN0010C
Anaerotest Indikatorstreifen	Merck KGaA, Deutschland	1.15112.0001
Becherglas 350 ml, niedrige Form	VWR International GmbH, Deutschland	213-1124
Becherglas 600 ml, niedrige Form	VWR International GmbH, Deutschland	213-1126
Chloroform	Merck KGaA, Deutschland	102445
Deckgläser 24 x 24 mm	Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Deutschland	5428393
Digalski-Spatel, Dreieck, Edelstahl, 165 mm x 40 mm	Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland	AL98.1
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen GmbH, Deutschland	69506
Eppendorf Quality™ Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland	0030 120.086
Erlenmeyerkolben 100 ml, Weithals	VWR International GmbH, Deutschland	214-1171
Erlenmeyerkolben 1000 ml, Enghals	VWR International GmbH, Deutschland	214-1134
Ethanol Rotipuran® ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland	90653
Fusselfreies Tuch – Light Duty Tissue Wipers	Zefa Laborservice GmbH, Deutschland	115-0202
Gram's Kristallviolett	Merck KGaA, Deutschland	1.092180.2500
Gram's Lugol'sche Lösung	Merck KGaA, Deutschland	1.09261.2500
Gram's Safranin	Merck KGaA, Deutschland	1.09217.2500
Homogenisationsbeutel mit Seitlichem Filter 400 ml	VWR International GmbH, Deutschland	129-0733
Immersionsöl	Merck KGaA, Deutschland	1.15577.0100
Impfösen Platin Iridium 3 mm ø	Zefa Laborservice GmbH, Deutschland	33 31 00003
Impfösenhalter, 240 mm	Zefa Laborservice GmbH, Deutschland	33 31 86442

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen (Fortsetzung)

Verbrauchsmaterial	Produzent	ArtikeInr.
ISOLATE II Genomic DNA Kit	Bioline GmbH, Deutschland	BIO:52066
LLG Pinzetten, 18/10 Stahl, 145 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Deutschland	6.255.826
Medizinische Untersuchungshandschuhe	VWR International GmbH, Deutschland	112-1879
N-Cetyl-Trimethyl-ammoniumbromid	Merck KGaA, Deutschland	102342
n-Hexan	Chemsolute	1964.1
Normalsterile Petrischalen	CLN GmbH, Deutschland	G-633 180
Objektträger mit Mattrand	Gerhard Menzel GmbH, Deutschland	5161145
Pipette 0,5–10 µl Eppendorf Research	Eppendorf AG, Deutschland	1097723
Pipette 100–1000 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Deutschland	4339211
Pipette 10–100 µl Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Deutschland	250942
Pipette 20–200 µl Eppendorf Research	Eppendorf AG, Deutschland	1581835
Pipettenspitzen 1 µl farblos	Eppendorf AG, Deutschland	SARS70.1130.600
Pipettenspitzen 10–1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland	ETY040.B
Pipettenspitzen 10–200 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland	ETY02.B
Propidium Monoazid (PMA)	Biotium, USA	40019
Reagenzglas, gerader Rand, 130 mm	VWR International GmbH, Deutschland	212-0318
RNA-freies H ₂ O	GE Healthcare Life Sciences	30538.03
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Bioline GmbH, Deutschland	BIO-98005: 500
Ständer für 1 Stomacherbeutel 400 Bag Open	Meintrup dws Laborgeräte GmbH, Deutschland	ME001502
Verdünnungsflüssigkeit	Merck KGaA, Deutschland	1072141000 & 1.06404.0500
Wattestäbchen steril mit Holzstab	Zefa Laborservice GmbH, Deutschland	10019036

3.3 Geräte

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Geräte für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen

Gerät	Produzent	Artikelnr.
Bruker Atolex Speed MALDI TOF/TOF Mass Spectrometer	Bruker Daltonic GmbH, Deutschland	-
Brutschrank Heraeus Incubator B 6420	Heraeus Holding GmbH, Deutschland	41182503
Densimat	Biomerieux GmbH, Deutschland	IDN 013204
Gasbrenner Fireboy S 1000	ibc Tecnomara GmbH, Deutschland	8901C767
Gasbrenner Gasprofi 1 SCS micro	WLD Tec GmbH, Deutschland	413773
Halogen-Sicherheitsleuchte	Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG, Deutschland	7598
Kühl-Gefrierkombi Liebherr Comfort	Liebherr International Deutschland	22.629.450.4
Mikroskop 377-976D	Robert Kind GmbH, Deutschland	50014
Mikroskop Leica 982	Leica Microsystems GmbH, Deutschland	800
MTP 384 Target plate ground steel BC	Bruker Daltonic GmbH, Deutschland	8280784
MTP 384 Target plate polished steel BC	Bruker Daltonic GmbH, Deutschland	8280781
Präzisionswaage CP 3202S-OCE	Sartorius AG, Deutschland	16407380
Real-time ThermoCycler	BIO-RAD Laboratories GmbH,	785 BR 07300
Standmixer	Krups, Deutschland	KB303110
Stomacher Bagmixer	Interscience, Frankreich	20615704
Thermomixer	Eppendorf AG, Deutschland	535530354
Zentrifuge	Eppendorf AG, Deutschland	62945

4 Methoden

4.1 Anzucht des Referenzstamms von *Campylobacter jejuni*

Der Referenzstamm wurde direkt nach der Entnahme aus der Mikrobank auf mCCDA-Platten subkultiviert. Die Agarplatten wurden unter mikroaerophiler Atmosphäre bei 41,5 °C für 48 Stunden bebrütet. Danach wurde die Keimsuspension auf einen McFarland-Trübungsstandard von 1,0 eingestellt, indem drei bis vier Einzelkolonien von der Reinkultur des Referenzstammes mit einer sterilen Öse aufgenommen und in eine mit 3 ml Natriumchlorid (NaCl, 0,85 %) gefüllte Glasküvette gegeben wurden, bevor der Trübungsstandard mittels eines Densimat-Photometers gemessen wurde.

Der McFarland-Trübungsstandard von 1,0 entspricht ca. $3,0 \times 10^8$ KbE/ml (Seeley und Vandemark, 1962; Köhler, 1975). Um die genaue Anzahl der *C. jejuni* zu ermitteln, wurde die McFarland-Suspension mit 0,85 % NaCl im Verhältnis 1:10 bis zu 10^{-8} verdünnt. Von den letzten vier Verdünnungen (10^{-5} – 10^{-8}) wurden jeweils 100 µl auf mCCDA-Platten ausgespatelt und unter mikroaerophiler Atmosphäre bei 41,5 °C für 48 Stunden bebrütet. Danach wurde die Anzahl der Kolonien auf der Platte ermittelt und auf die koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) der ursprünglichen McFarland-Suspension zurückgerechnet. Mithilfe dieser Information konnten anschließend *C.-jejuni*-Suspensionen von 10^7 – 10^2 KbE/ml NaCl hergestellt werden, mit denen im Rahmen der Versuche Eiklar, Eidotter und Eierschale kontaminiert wurden (siehe Abschnitt 4.5). Aus den künstlich kontaminierten Proben wurde die DNA extrahiert und als Standard für die Quantifizierung mittels qPCR verwendet.

Für die weiteren Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.3 und Abschnitt 4.7) wurde der Referenzstamm *C. jejuni* DSM 4688 wöchentlich aus der Mikrobank (bei -80 °C) entnommen und direkt auf mCCDA-Platten subkultiviert.

Die Agarplatten wurden unten mikroaerophiler Atmosphäre bei 41,5 °C für 48 Stunden bebrütet. Die Keimsuspension in NaCl wurde wie oben beschrieben auf einen McFarland-Trübungsstandard von 1,0 (entspricht ca. $3,0 \times 10^8$ KbE/ml) eingestellt. Danach wurden die Keimsuspension auf bestimmte Konzentration (zum Beispiel ca. 10^6 , 10^5 und 10^4 KbE/ml) ebenfalls in 0,85 % NaCl verdünnt, bevor sie für die Überprüfung der Kontaminationsmöglichkeit (siehe Abschnitt 4.3) und die Lebend-Tot-Differenzierung (siehe Abschnitt 4.7) verwendet wurden.

4.2 Bestimmung der Mikrobiota auf SPF-Eiern

Die SPF-Eier wurden vor Verwendung mikrobiologisch überprüft, um herauszufinden welche Keime auf der Eierschale vorkamen und um anschließend einschätzen zu können, ob diese die Spezifität und Sensitivität der nachfolgenden Versuche beeinflussen konnten (siehe Abschnitt 4.5.3). Dazu wurden zehn SPF-Eier in je 100 ml 0,85 %ige-Natriumchlorid-Flüssigkeit gelegt und für zwei Minuten abgespült. Die abgespülten Lösungen wurden auf je zwei Blutagar- und Plate-Count-Agarplatten ausgespatelt. Dazu wurden auf jede Platte 0,1 ml der Lösung aufgetragen. Die Blutagar- und Plate-Count-Agarplatten wurden anschließend jeweils aerob und anaerob über 24 Stunden bei 37 °C bzw. 30 °C bebrütet.

Nach 24 Stunden wurden die Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS auf Spezies-Ebene identifiziert (siehe Abschnitt 4.6). Von diesen Kolonien wurde zusätzlich die DNA extrahiert und anschließend eine qPCR für *Campylobacter* spp. durchgeführt, um auszuschließen, dass das qPCR-Protokoll die DNA anderer Mikrobiota der Eierschale ebenfalls amplifiziert.

4.3 Challengeversuche mit Eiern

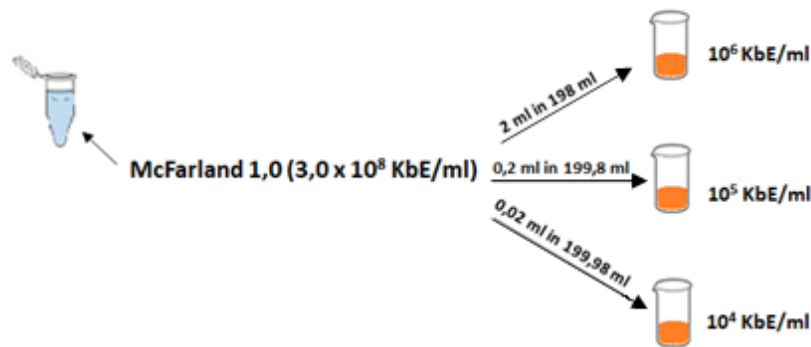
4.3.1 Methodischer Ablauf

Für die Durchführung der Challengetests wurde zunächst das Inokulum hergestellt. Im Anschluss folgten die Applikation der Pathogensuspension auf die Eier und danach das Aufschlagen der Eier mit Trennung von Eidotter und Eiklar. Abbildung 7 gibt eine Übersicht über den methodischen Ablauf der Challengetests mit den Eiern.

4.3.2 Herstellung des Inokulums

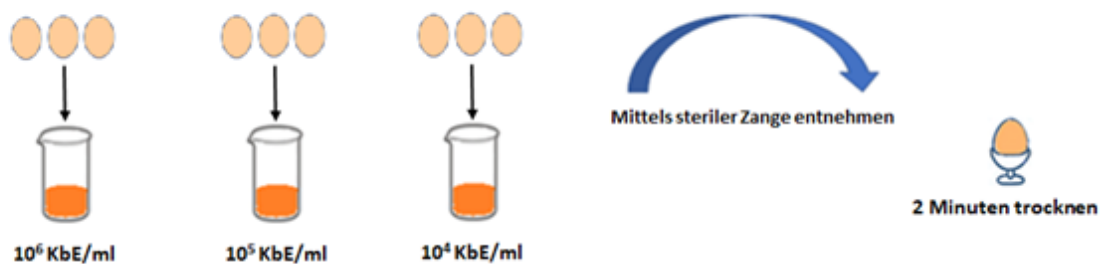
Für die Untersuchungen wurden die SPF-Eier mit dem zuvor hergestellten *C. jejuni*-Inokulum kontaminiert. Hierzu wurde zunächst die Keimsuspension auf den McFarland-Trübungsstandard von 1,0 eingestellt (entspricht ca. $3,0 \times 10^8$ KbE/ml, siehe Abschnitt 4.1). Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe auf drei gewünschte Konzentrationen von *C. jejuni* von ca. 10^6 bis 10^4 KbE/ml im 200 ml Inokulum (Eintauchsuspension) angelegt. Zur Anlegung der Eintauchsuspension mit 10^6 KbE/ml, 10^5 KbE/ml und 10^4 KbE/ml wurden aus der ursprünglichen McFarland-Suspension jeweils 2 ml, 0,2 ml und 20 µl entnommen und mit 198 ml, 199,8 ml und 199,98 ml destilliertem Wasser vermischt.

1. Herstellung des Inokulums



2. Künstliche Applikation mit *C. jejuni*

Jeweils 3 Eier nacheinander für 2 Minuten eintauchen



3. Trennung Eidotter und Eiklar

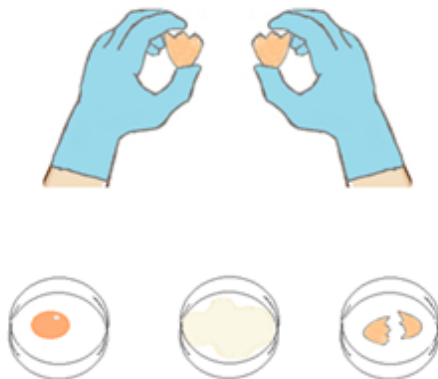


Abbildung 7: Schematische Darstellung zum Ablauf der Challenge tests

4.3.3 Künstliche Applikation mit *Campylobacter jejuni*

Für die künstliche Applikation mit *C. jejuni* wurden drei Eier nacheinander in die jeweilige Tauchsuspension eingelegt. Das Volumen der Eintauchsuspension von 200 ml wurde benötigt, damit beim Eintauchen des Eis die komplette Schale bedeckt war. Nach einer Einlegzeit von zwei Minuten wurden die Eier mit einer sterilen Zange entnommen und für weitere zwei

Minuten zum Trocknen in sterile Metalleierbecher gegeben. Im Anschluss wurden die Eier wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben aufgeschlagen und der Inhalt manuell getrennt.

4.3.4 Trennen von Eidotter und Eiklar

Untersucht wurde das manuelle Trennen des Eiinhalts in Eiklar und Eidotter durch wiederholtes Hin- und Herlaufen lassen von einer Hälfte der Schale eines aufgeschlagenen Eis in die andere. Vor dem Aufschlagen wurden die Eier zunächst gewogen. Danach wurden die Eier aufgeschlagen, der Eiinhalt mithilfe der Schale getrennt und das Eiklar, der Eidotter und die Schale in Petrischalen aufgefangen. Im Anschluss daran wurde jede Probe des Eiklars bzw. des Eidotters in einer Petrischale mit einer Pipettenspitze durchgerührt, um die ggf. vorhandenen *C. jejuni* möglichst gleichmäßig zu verteilen. Die Eierschale wurde eingewogen und im Verhältnis 1:10 (g/ml) mit Verdünnungsflüssigkeit homogenisiert. Für das Herstellen eines Liters der Verdünnungsflüssigkeit wurden 1 l Aqua dest., 8,5 g NaCl und 1 g Pepton aus Fleisch benötigt. Für jede Eiprobe wurden neue Handschuhe verwendet, um eine mögliche Kreuzkontamination zwischen den Proben zu vermeiden. Drei Probenarten (Eierschalensuspension, Eiklar und Eidotter) wurden mikrobiologisch und molekularbiologisch auf *C. jejuni* untersucht, die Eintauchsuspensionen jedoch nur molekularbiologisch überprüft.

Die Reproduzierbarkeit wurde im Zweifachansatz überprüft. Die Durchführung erfolgte mit einer Gruppe aus fünf Personen (Kodierung A–E), die unabhängig voneinander Eier aufschlugen und den Eidotter vom Eiklar nach vorgegebenem Protokoll (siehe oben) zu trennen hatten. Jeder Ansatz umfasste zwei Eier. Ein Ei wurde mit einer konstanten *C.-jejuni*-Konzentration in der Tauchsuspension behandelt. Ein weiteres Ei diente als Negativkontrolle.

Alle vier Probenarten (Eintauchsuspension, Eierschalensuspension, Eiklar und Eidotter) wurden im Anschluss molekularbiologisch mittels qPCR untersucht. Die DNA-Extraktion wurde wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben durchgeführt.

4.4 Mikrobiologische Untersuchung auf *Campylobacter jejuni*

4.4.1 Eierschale

Zur Herstellung der Eierschalensuspension für die kulturelle und molekularbiologische Untersuchung (siehe Abschnitt 4.5) auf das Vorhandensein von *C. jejuni*, wurde die Eierschale

eingewogen und im Verhältnis 1:10 (g/ml) mit Verdünnungsflüssigkeit vermischt (siehe Abbildung 8). Anschließend wurde die Mischung 30 Sekunden im Stomacher homogenisiert. Die so entstandene Eierschalensuspension wurde in ein 10-ml-Reaktionsröhrchen übertragen. Für den kulturellen Nachweis wurden zweimal jeweils 0,1 ml Volumen auf je eine mCCDA-Platte ausgespatelt, d. h. insgesamt zwei mCCDA-Platten, und unter mikroaerophiler Atmosphäre bei 41,5 °C für 48 Stunden bebrütet. Danach wurde die Anzahl der Kolonien gezählt und die Menge der koloniebildenden Einheiten pro Gramm (KbE/g) Eierschale berechnet.

4.4.2 Eihalt

Vom Eiklar und Eidotter wurden je Ei jeweils 0,1 ml mittels Pipettenspitze auf je eine mCCDA-Platte übertragen und anschließend ausgespatelt (siehe Abschnitt 4.4.2). Die Pipettenspitze (1 ml) wurde zuvor abgeschnitten, um den zähflüssigen Eihalt besser pipettieren zu können. Die mCCDA-Platten wurden unter mikroaerophiler Atmosphäre bei 41,5 °C für 48 Stunden bebrütet. Danach wurde die Anzahl der Kolonien gezählt und die koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) Eihalt berechnet. Abbildung 8 stellt die Kontamination der Eierschale mit *C. jejuni* in Eintauchsuspension sowie die anschließende Trennung des Eihalts und die Anzucht auf der mCCDA-Platte schematisch dar.

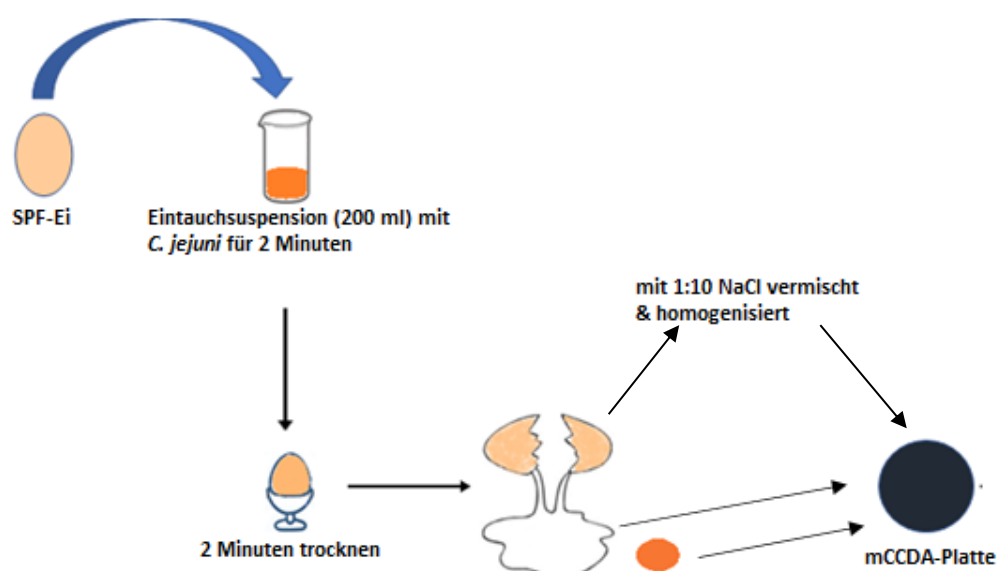


Abbildung 8: Kontamination der Eierschale, Trennung des Eihalts und Anzucht auf mCCDA-Platte

4.5 Molekularbiologische Untersuchung auf *Campylobacter jejuni*

4.5.1 Methode der DNA-Extraktion

4.5.1.1 Eiinhalt

Zur Extraktion von DNA aus dem Eiinhalt wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt fünf verschiedene Protokolle eingesetzt und miteinander verglichen.

Methode 1: Isolate Genomic II DNA Extraktionskit (Bioline)

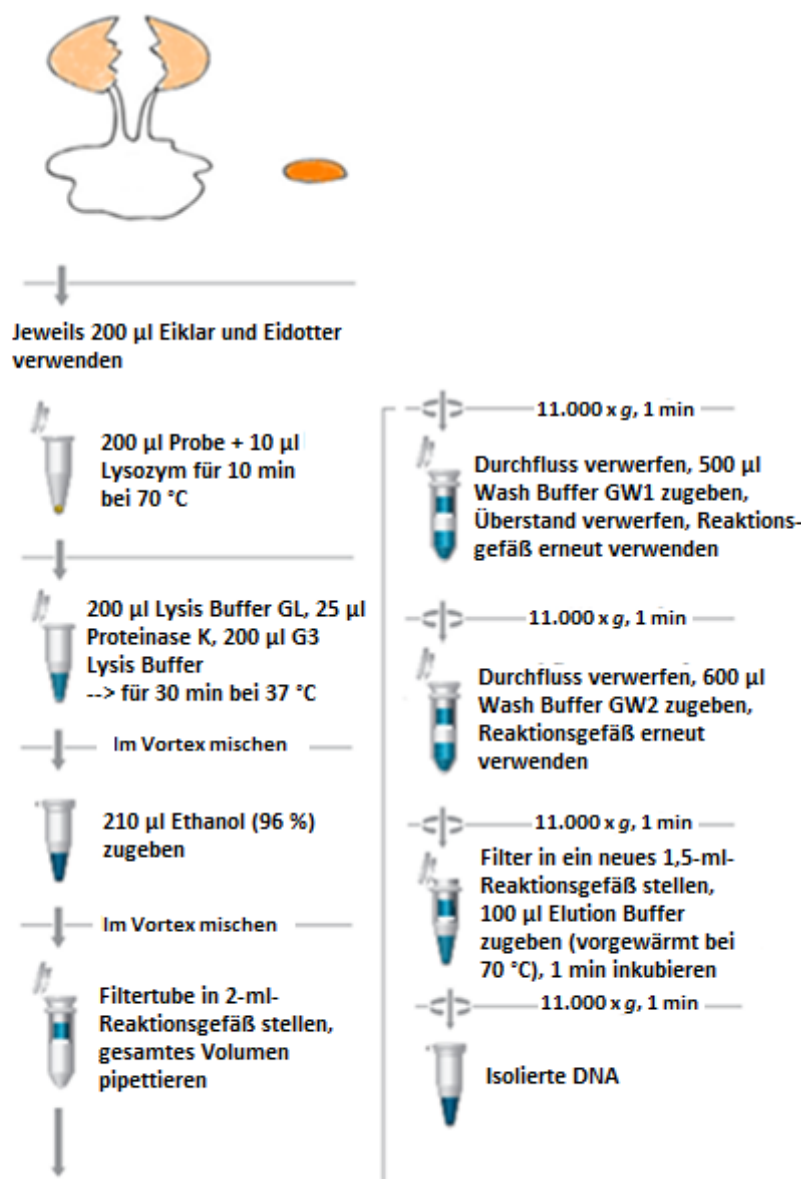


Abbildung 9: DNA-Extraktion mittels Isolate Genomic II DNA Extraktionskit (Bioline)

Als Methode 1 wurde das Isolate Genomic II Kit von Bioline (siehe Abbildung 9) angewandt. Insgesamt wurden dafür fünf SPF-Eier, demnach fünfmal Eiklar und fünfmal Eidotter, mit jeweils sechs Ansätzen beprobt. Diese wurden aufgeschlagen, dann wurden Eiklar und Eidotter mittels der Eierschale getrennt. Von den jeweiligen Inhalten wurden 180 µl in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen gefüllt und mit 20 µl der *C. jejuni*-Suspension aufgefüllt, um insgesamt 200 µl zu erhalten. Um eine Kontamination des Inhalts von 10^6 KbE/ml zu erhalten, wurden 20 µl der 10^7 -KbE/ml-*C. jejuni*-Suspension zugegeben. Das gleiche Prinzip wurde für die anderen Logstufen, 10^5 – 10^1 KbE/ml, angewendet. Als nächstes wurde 10 µl Lysozym (20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl; pH 8,0; Endkonzentration = 1 mg/ml) zugegeben und die Lösung bei 37 °C für 30 Minuten im Thermomixer inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte sind in Abbildung 9 dargestellt. Die DNA-Extrakte wurden bis zur PCR-Analyse bei -20 °C eingefroren.

Methoden 2 und 3: Isolate Genomic II DNA Extraktionskit (Bioline) mit Modifikationen

Bei Methode 2 handelt es sich um eine modifizierte Version der ersten, bei der jedoch das Eiklar und der Eidotter nach der Beimpfung mit der Bakteriensuspension bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert wurden, damit sich die Bakterienzellen im unten gebildeten Pellet befanden. Der Überstand von 180 µl wurde abpipettiert und verworfen und die Probe mit 500 µl Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgefüllt und kurz im Vortex gemischt, um das Pellet zu waschen. Der Reaktionstube wurde noch mal bei 11.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Dann wurden ca. 500 µl des Überstands abpipettiert und ebenfalls verworfen. Darauf wurden 180 µl Lysis Buffer GL, 25 µl Proteinase K und 200 µl Lysis Buffer G3 zugegeben. Die nachfolgenden Schritte wurden wie in Methode 1 beschrieben durchgeführt.

Die dritte Methode unterschied sich von der zweiten nur dadurch, dass nach dem Zugeben von 500 µl PBS und dem anschließenden Zentrifugieren und erneuten Verwerfen des Überstandes nochmals mit 200 µl PBS aufgefüllt wurde. Der nächste Schritt von Methode 3 unterschied sich wieder von Methode 1 dadurch, dass 180 µl Lysis Buffer GL und 25 µl Proteinase K zugegeben wurden. Alle weiteren Schritte waren identisch zu Methode 1 und Methode 2 (siehe Abbildung 9).

Methode 4: CTAB-DNA Extraktionsmethode

Bei Methode 4 wurde Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet, um die DNA zu extrahieren. Die CTAB-Suspension bestand aus 234 mg NaCl, 500 ml CTAB und 75 ml H₂O.

Eiklar und Eidotter wurden zuerst wie bei Methode 1 mit *C. jejuni* von 10^6 bis 10^2 KbE/ml künstlich kontaminiert. Die nächsten Schritte der DNA-Extraktion sind Abbildung 10 zu entnehmen. Das verwendete Glycogen hatte eine Konzentration von 5 mg/ml. Wenn die PCR nicht direkt durchgeführt wurde, wurde die DNA bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

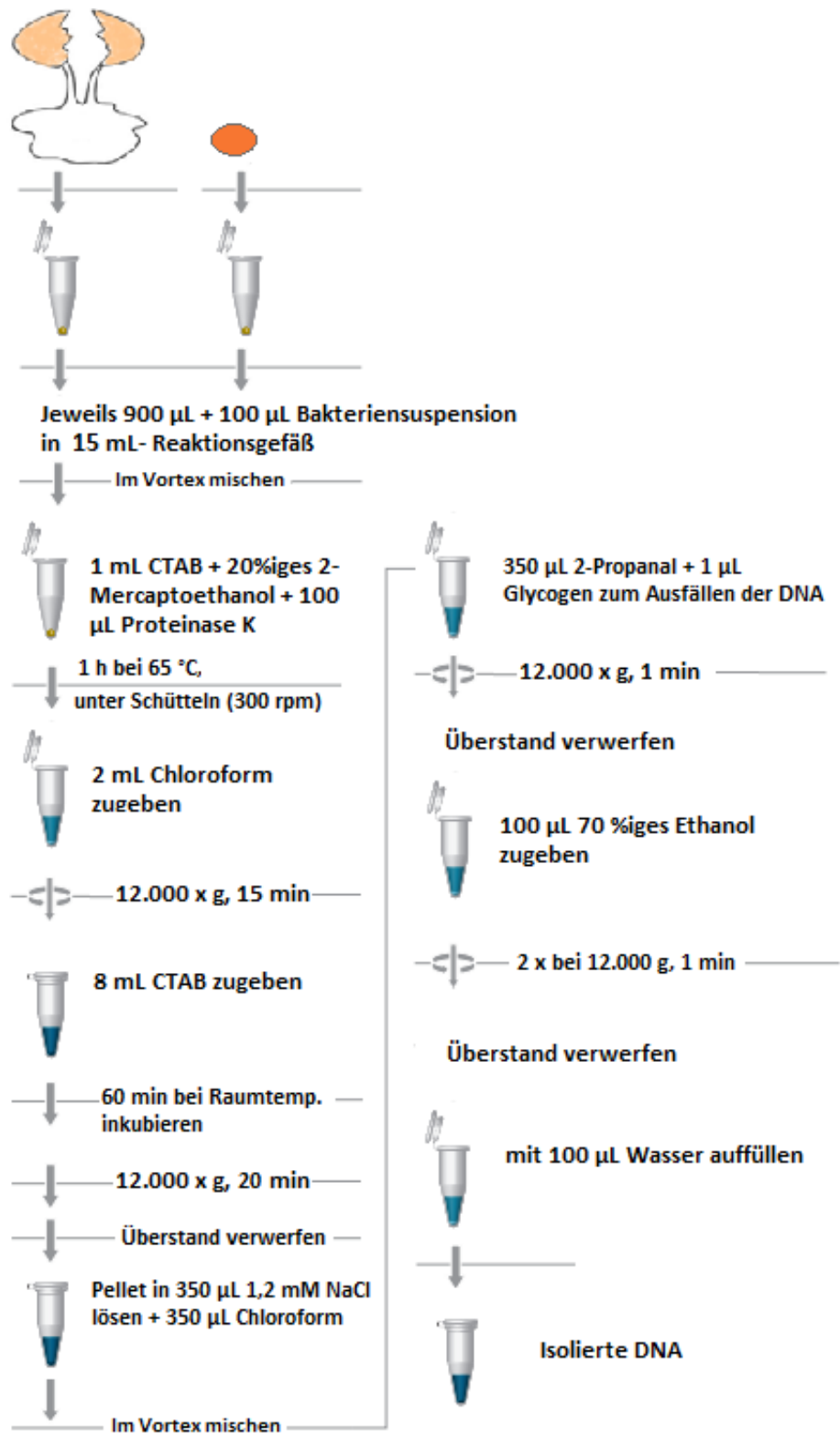


Abbildung 10: DNA-Extraktion mittels CTAB

Methode 5: DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen)

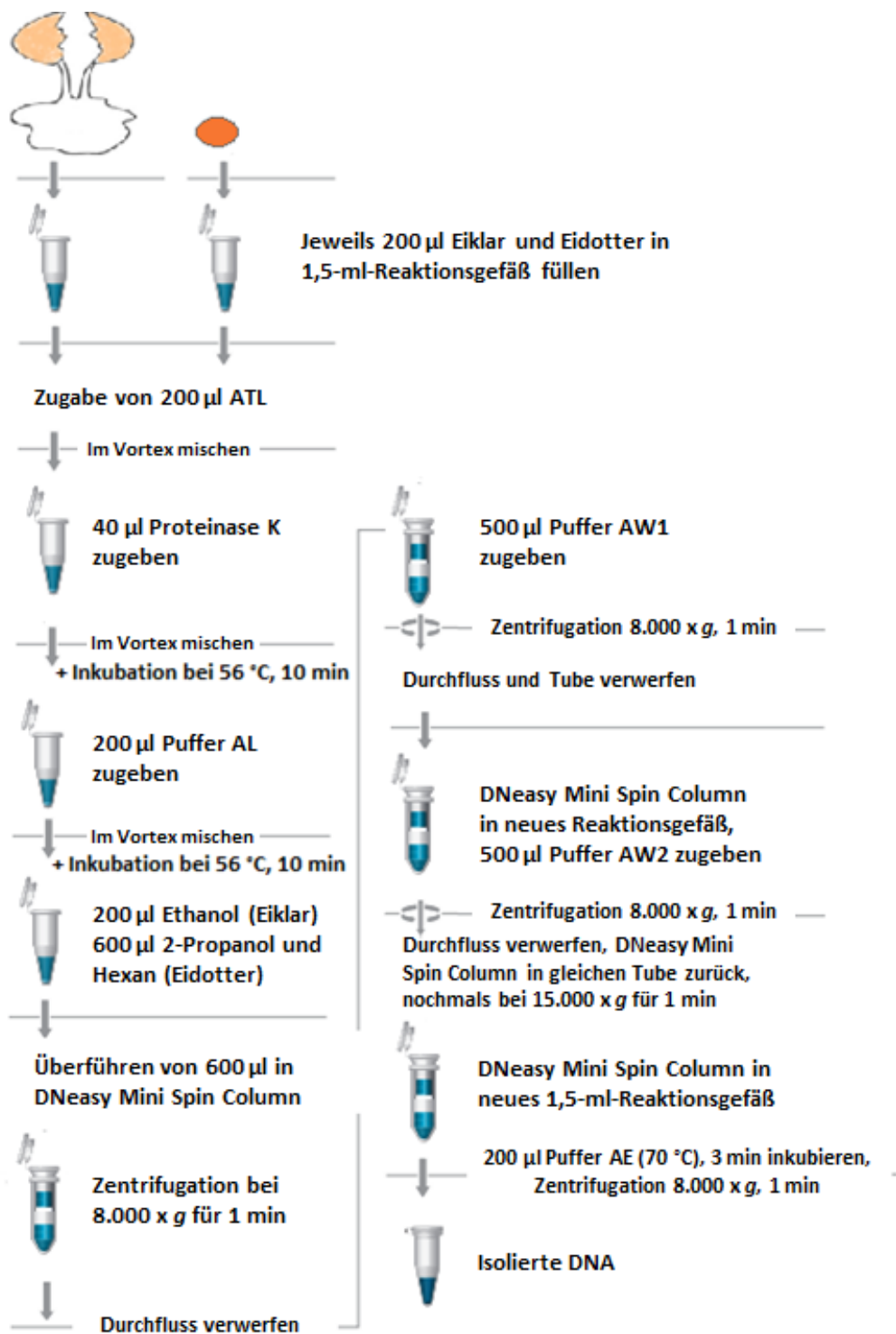


Abbildung 11: DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)

Als fünfte DNA-Extraktionsmethode wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen genutzt. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 11 dargestellt. Bei dem verwendeten Ethanol handelt es sich wieder um eine 96–100 %ige Lösung. Das 2-Propanol und Hexan wurde in

einem Volumenverhältnis von 1:2 gemischt. Nach der DNA-Extraktion lag die DNA im Eluat vor und wurde bis zur Verwendung bei +2 °C bis +8 °C aufbewahrt. Verging bis zur Durchführung der PCR mehr als eine Woche, wurden die Extrakte bei -20 °C gelagert.

4.5.1.2 Eierschale

Die Herstellung der Eierschalensuspension für die SPF-Eier, die Untersuchung der Eierschale und die Trennung des Eiinhalts erfolgten wie in Abschnitt 4.3 beschrieben.

Danach wurde die Vorbereitung der Eierschalensuspension für die Eierschale optimiert, indem die Mischung aus Eierschale und Verdünnungsflüssigkeit im Verhältnis 1:10 (g/ml) nicht mit dem Stomacher, sondern mit einem Mixer für 30 Sekunden homogenisiert wurde. Für die Eier aus dem Handel wurden die Eierschalen von drei Eiern aus der gleichen Packung gepoolt und gewogen, bevor sie mit Verdünnungsflüssigkeit homogenisiert wurden. Im Anschluss daran wurde die entstandene Eierschalensuspension durch eine Tüte mit Filterpapier gefiltert und ca. 45 ml in ein 50-ml-Reaktionsröhrchen übertragen. Der Rest wurde verworfen.

Für die Bestimmung des Standards für die qPCR wurden 900 µl Eierschalensuspension der SPF-Eier mit 100 µl der 10^7 -KbE/ml-Suspension der *C. jejuni* (DSM 4688), die zuvor wie in Abschnitt 4.1 beschrieben hergestellt wurde, künstlich kontaminiert. Diese Mischung entspricht 1×10^6 KbE/ml Eierschalensuspension, die aus der gleichen Probenmatrix bis 10^1 KbE/ml weiter verdünnt wurde. Die zur Kontaminierung mit *C. jejuni* verwendete Eierschalensuspension wurde zuvor wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben vorbereitet.

Von jeder homogenisierten Eierschalensuspension bzw. Verdünnungsreihe wurde 1 ml in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei $12.000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand von 800 µl wurde abpipettiert und verworfen. Die übrigen 200 µl wurden wie beim Eiklar mittels DNeasy Blood and Tissue Kit für die DNA-Extraktion verwendet. Die Eierschalensuspension wurde im Gegensatz zum Eiinhalt nicht mit verschiedenen DNA-Extraktionsmethode getestet, sondern es wurde die Methode, die beim Eiinhalt das beste Ergebnis zeigte, für die Eierschalensuspension verwendet.

4.5.1.3 Reinkultur auf Festmedien

Die Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

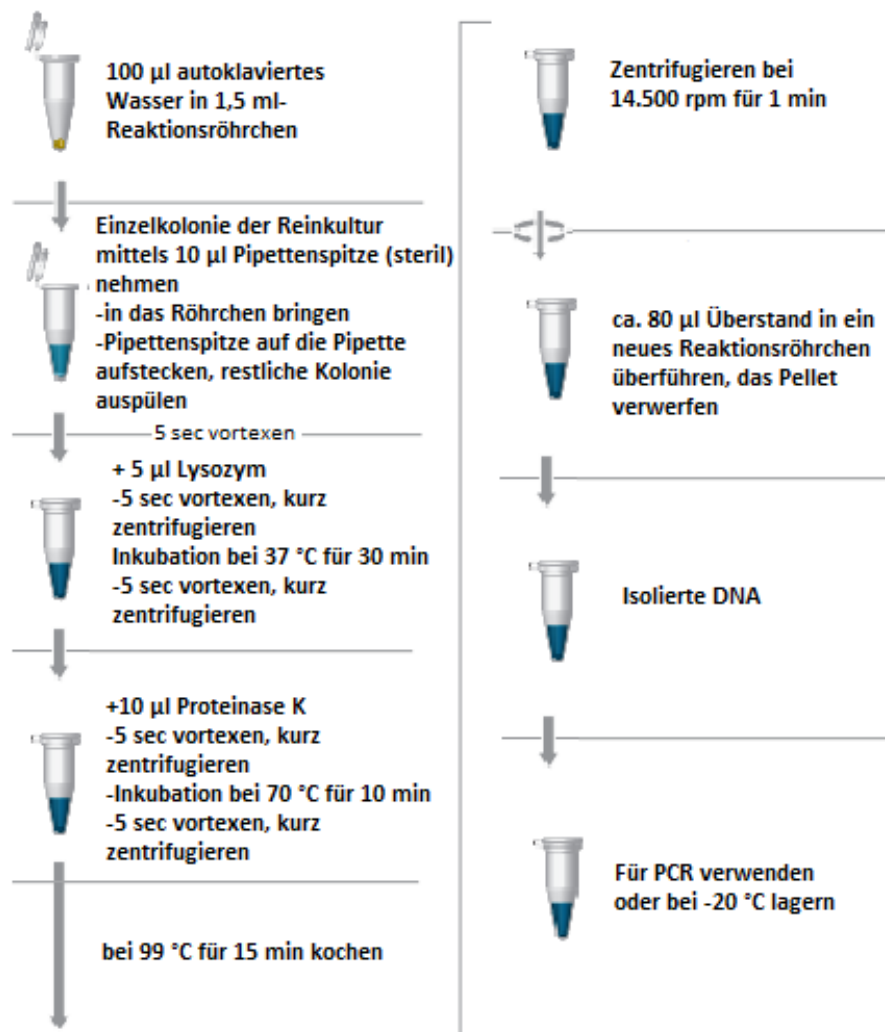


Abbildung 12: DNA-Extraktionsmethode für die Reinkultur auf Festmedien

Für die DNA-Extraktion der Reinkultur von Bakterien wurden zunächst 100 μ l autoklaviertes Wasser in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen gegeben. Im Anschluss daran wurde eine Einzelkolonie der Reinkultur mit einer sterilen 10- μ l-Pipettenspitze entnommen und ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Die Pipettenspitze wurde auf die Pipette gesteckt und die restliche Kolonie ausgespült. Danach wurde die Suspension für fünf Sekunden im Vortex gemischt. Die nächsten Schritte sind Abbildung 12 zu entnehmen. Die Endkonzentrationen von Lysozym und Proteinase K in der Reaktion waren 1,0 mg/ml und 0,2 mg/ml. Für die Inkubationen, die einmal bei 70 °C und einmal bei 99 °C durchgeführt wurden, wurde ein Eppendorf-Thermomixer verwendet.

4.5.2 qPCR

Um die DNA-Fragmente nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) angewendet. Hier kam ein spezifisches Primerpaar für *C. jejuni* und *C. coli* zum Einsatz. Der Forward Primer ist pg50 (5'-ATGGGATTTTCGTATTAAC-3') und der Reverse Primer ist pg3 (5'-GAACTTGAACCGATTTG-3', (Oyofu et al., 1992)). Die beiden Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) hergestellt. Das Primerpaar amplifiziert den Genabschnitt der beiden tandemartig orientierten Flagellin-Gene von VC167. Diese Oligonukleotide befinden sich in einer Region des flaA-Gens, die sich in DNA-Hybridisierungsstudien als hoch konserviert zwischen *C.-jejuni*- und *C.-coli*-Stämmen erwiesen hat (Thornton et al., 1990). Die Größe des Amplifikats betrug 458 Basenpaare.

Für die PCR wurde eine 20- μ l-Suspension hergestellt, die aus den folgenden Bestandteilen zusammengesetzt war: 0,2 μ M für jeden Primer, 10 μ l SensiFast No-Rox SYBR (Bioline), 2 μ l der DNA-Probe und RNA-freies H₂O bis das Gesamtvolumen 20 μ l betrug. Die PCR wurde mittels Biorad CFX96 Touch™ (Biorad) durchgeführt.

Die qPCR lief mit folgendem, sich für jeden Zyklus wiederholenden Programm ab: die initiale Denaturierung bei 95 °C für drei Minuten und für jeden PCR-Zyklus die Denaturierung bei 95 °C für zehn Sekunden, das Annealing der Primer bei 50 °C für fünf Sekunden und die Elongation bei 72 °C für 15 Sekunden. Insgesamt wurden 50 PCR-Zyklen durchlaufen. Anschließend wurde die Schmelzkurve der Amplifikate analysiert, indem die Reaktionsgefäße mit einer Temperaturerhöhung von 0,5 °C für fünf Sekunden von 65 °C bis auf 95 °C erhitzt wurden. Bei jeder PCR wurden ebenfalls die Verdünnungsreihen der *C. jejuni*-Standardsuspension (10⁶–10² KbE/ml Eierschalensuspension, siehe Abschnitt 4.1 und Abschnitt 4.5.1) für die Quantifizierung verwendet.

Die weitere qPCR wurde mit dem Universal-Primerpaar durchgeführt, das für den Genabschnitt der 16S-rRNA der Bakterien spezifisch ist. Die beiden Primer waren 8-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', (Turner et al., 1999)) und 926-R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3', (Schwieger und Tebbe, 1998)). Das PCR-Protokoll war ähnlich wie das für das Primerpaar pg50 und pg3, außer dass das Annealing bei 56 °C für fünf Sekunden und die Elongation bei 72 °C für 20 Sekunden stattfanden. Die PCR mit dem Primerpaar 8-F und 926-R wurde für die Extrakte der Eierschalen-Isolate (siehe

Abschnitt 4.4.1) verwendet, um zu bestätigen, dass die DNA-Extraktion der Keime erfolgreich war, bevor sie weiter mit der qPCR für *Campylobacter* spp. getestet wurden.

4.5.3 Spezifität und Sensitivität des qPCR-Protokolls.

Um zu gewährleisten, dass die Spezifität der qPCR für *C. jejuni* hinreichend hoch war, wurden noch weitere Keime, die von der Schale der SPF-Eier isoliert wurden (siehe Abschnitt 4.2), mit dem qPCR-Verfahren für *C. jejuni* getestet, um sicherzustellen, dass die PCR ausschließlich *C. jejuni* und *C. coli* erfasst und nicht auch auf andere vorhandene Bakterien reagiert.

Um die Sensitivität bzw. die Nachweisgrenze der qPCR (KbE/ml für den Eiinhalt bzw. KbE/g für die Eierschale) zu beurteilen, wurde die Verdünnungsreihe von *C. jejuni* (siehe Abschnitt 4.1) direkt in die Probe (Eierschalensuspension, Eiklar und Eidotter) gegeben und diese dadurch mit einer Konzentration von 10^6 bis 10^2 KbE/ml künstlich kontaminiert. Anschließend wurde die DNA extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden der qPCR mit der beschriebenen Zusammensetzung der Komponenten und dem beschriebenen qPCR-Protokoll unterzogen. Die künstliche Kontamination und die DNA-Extraktion der Eierschalensuspension wurden einmalig durchgeführt. Aufgrund der komplexen Matrices wurde dieses Verfahren für Eiklar und Eidotter zur Bestätigung der Reproduzierbarkeit dreimal wiederholt.

4.6 MALDI-TOF MS

Für die Identifizierung der auf den Eiern vorhandenen Mikrobiota mittels MALDI-TOF MS wurde als Ausgangsmaterial eine saubere Einzelkolonie aus Blut- oder Plate-Count-Agar benötigt (siehe Abschnitt 4.2). Hierzu wurden die Bakterienkolonien mit einem Zahnstocher direkt von der Agarplatte entnommen und auf die Targetplatte übertragen.

Die Targetplatte kann je nach Format hundert oder mehr Proben aufnehmen. Pro Kolonie wurden drei Targetplätze befüllt. Danach wurde das Target bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss daran wurde auf jeden Targetplatz 1 μ l 70 %ige Ameisensäure pipettiert und das Target erneut getrocknet. Danach wurde auf die Targetplätze 1 μ l 70 %ige ACCA-matrix (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) pipettiert und das Target wiederum bei Raumtemperatur getrocknet. Die anschließende Proteinanalyse erfolgte mittels MALDI-TOF MS der Firma Bruker. Dafür wurde die Probenplatte in das Gerät eingeschoben, ein Vakuum angelegt und die Proben nacheinander mit einem Laserstrahl verdampft.

4.7 Lebend-Tot-Differenzierung mittels Propidium-Monoazid (PMA)

4.7.1 Behandlung der Probe mit PMA

Die Probe wurde zuerst mit dem Farbstoff Propidium-Monoazid (PMA) behandelt, danach wurde die DNA-Extraktion durchgeführt. Im Anschluss folgte eine qPCR. Die Methode wurde für die Untersuchungen der Eierschalen der Eier aus dem Handel angewendet.

Im Rahmen der Studie wurden zuerst zwei PMA-Endkonzentrationen in der Probe, 10 μM und 25 μM , getestet, um herauszufinden, welche Konzentration für die Durchführung der Versuche geeignet ist. Das Vorgehen zur Behandlung der Probe mit PMA ist in Abbildung 13 dargestellt.

Den Ausgangspunkt bildet der McFarland-Standard von 1,0, der in etwa einer Konzentration von 3×10^8 KbE/ml entspricht (siehe Abschnitt 4.3.2). Danach wurden zwei Aliquots hergestellt, wobei einer die Frischkultur mit Verdünnungsflüssigkeit von 1,5 ml enthielt und der andere die tote Kultur, die 15 Minuten bei 72 °C erhitzt wurde. Die beiden Aliquots wurden wie die SPF-Eierschalensuspension verdünnt, um eine Konzentration von 10^5 KbE/ml bis 10^3 KbE/ml zu erhalten. Anschließend wurde 1 ml der Probe in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert.

Im nächsten Schritt wurden zwei unterschiedliche PMA-Konzentrationen miteinander verglichen, 5 μl PMA von 2 mM Stammlösung (entspricht 10 μM) und 12,5 μl PMA von 2 mM Stammlösung (entspricht 25 μM). Somit ergaben sich für jede der drei Konzentrationen drei Aliquots: Aliquot 1 mit 1 ml Suspension der Frischkultur der jeweiligen Verdünnungsstufe ohne PMA, Aliquot 2 mit 1 ml Suspension der Frischkultur der jeweiligen Verdünnungsstufe und PMA in der entsprechenden Konzentration und Aliquot 3 mit 1 ml Suspension der jeweiligen Verdünnungsstufe als tote Kulturen und PMA in der entsprechenden Konzentration.

Die in Alufolie eingewickelten Proben wurden im Thermomixer bei 37 °C bei 550 rpm über 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelegt und mit Licht (Halogenlampe von 1000 W) für insgesamt fünf Minuten bestrahlt, wobei die Proben nach zweieinhalb Minuten auf die andere Seite gedreht wurden. Im Anschluss daran wurden die Proben durch Zentrifugation bei $13.000 \times g$ für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand von 980 μl wurde verworfen und mit den übrigen 20 μl weitergearbeitet. Diese wurden mit 180 μl NaCl-Lösung

aufgefüllt, sodass das Gesamtvolumen wieder bei 200 µl lag. Das Vorgehen wurde insgesamt zweimal in identischer Weise durchgeführt.

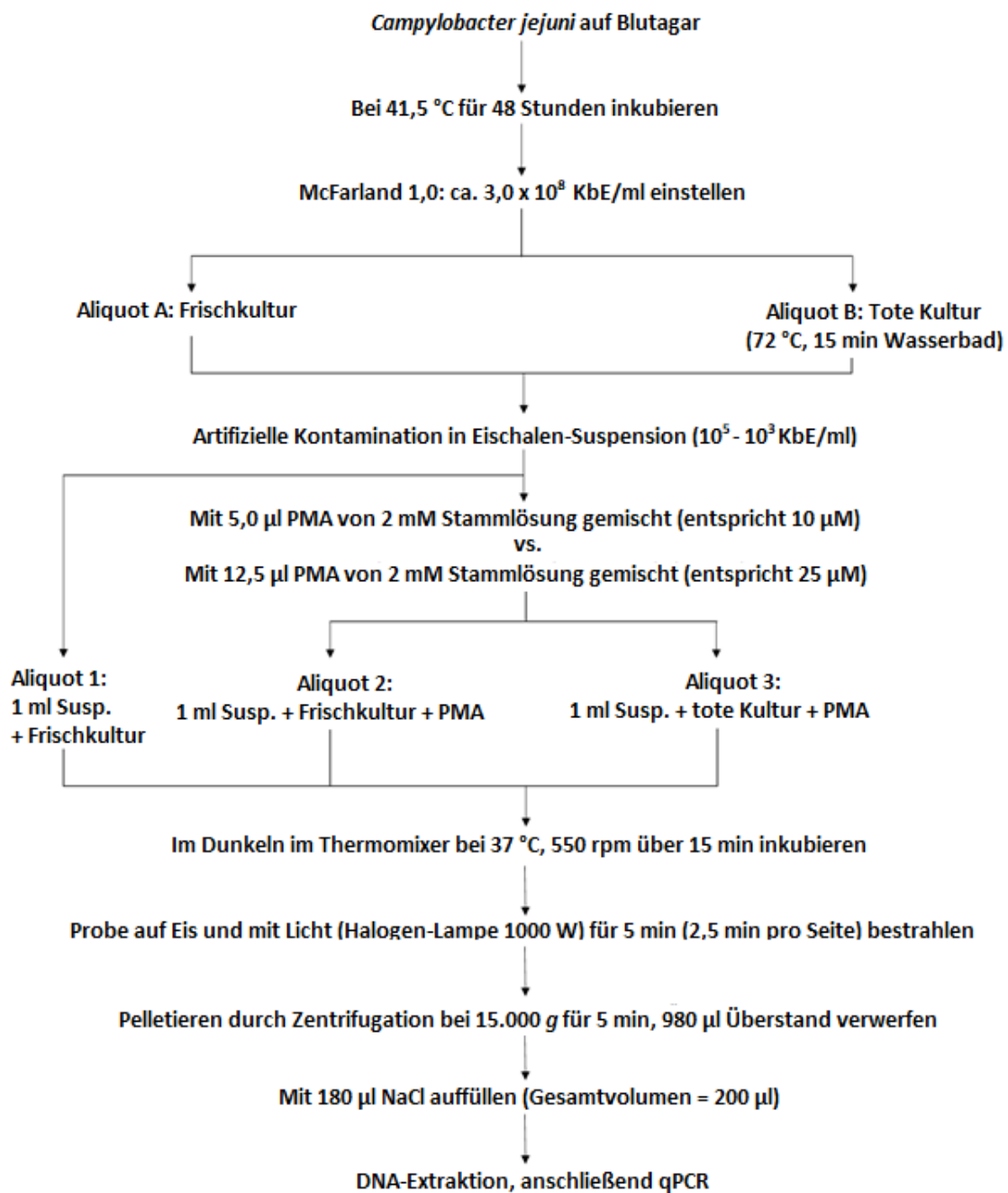


Abbildung 13: Fließschema der Behandlung von *C. jejuni* mit Propidium-Monoazid (PMA)

4.7.2 DNA-Extraktion und qPCR

Nach der Behandlung mit PMA wurde die DNA-Extraktion aus den Proben nach der Anleitung des DNeasy Blood and Tissue Kits von Qiagen durchgeführt. Die anschließende qPCR mit den Standards für die Quantifizierung der amplifizierten DNA wurde wie im Abschnitt 4.5.2

vorgenommen. Die Ergebnisse der beiden PMA Konzentrationen (10 μM vs. 25 μM) wurden verglichen.

4.8 Untersuchung der Eierproben aus dem Handel

Die aus dem Handel erworbenen Eier stammten von Tieren aus Öko-, Freiland- und Bodenhaltung (siehe Tabelle 6). Für jede dieser Haltungsformen wurden zehn verschiedene Produzenten aus dem Angebot verschiedener Supermärkte zufällig ausgewählt. Die Eierproben wurden mit der oben beschriebenen PMA-Behandlung und anschließenden qPCR auf lebende *Campylobacter* (*C. jejuni* und *C. coli*) untersucht.

Pro Probe und Haltungsform wurden jeweils drei Eier verwendet. Zunächst wurden die Eier aufgeschlagen, der Eiinhalt verworfen und die Eierschalen von drei Eiern derselben Packung in einem Pool zusammengetragen. Die drei Schalen wurden gemeinsam gewogen und dann mit Verdünnungsflüssigkeit 1:10 verdünnt und im Mixer zerkleinert und homogenisiert.

Die Suspension der drei Eier wurde in einem 50-ml-Reaktionsröhrchen aufgefangen. Von dort wurden drei unterschiedliche 1,5-ml-Reaktionsröhrchen jeweils mit 1 ml der Eierschalensuspension befüllt. Das erste wurde nicht weiterbearbeitet, das zweite wurde mit 5 μl PMA behandelt, was 10 μM PMA-Endkonzentration entspricht. Das dritte Reagenz wurde 15 Minuten bei 72 °C erhitzt und anschließend ebenfalls mit 10 μM PMA behandelt. Die nächsten Schritte wurden wie in Abbildung 11 dargestellt durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Mikrobiota auf Eiern

Auf sämtlichen Eiern wurden Mikroorganismen nachgewiesen. Tabelle 10 zeigt die Bakterienarten auf der Eioberfläche der SPF-Eier und den zugehörigen MALDI-TOF-MS-Score.

Tabelle 10: Mikrobiota auf der Eioberfläche der SPF-Eier

Organismus	MALDI-TOF-Score*
<i>Corynebacterium xerosis</i>	2,20 – 2,31
<i>Corynebacterium xerosis</i>	2,20 – 2,26
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,90 – 2,11
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,75 – 1,93
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,71 – 1,72
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	1,59 – 2,11
<i>Enterococcus hermanniensis</i>	1,78 – 1,90
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1,72 – 1,74
<i>Kocuria carniphila</i>	1,47 – 1,72
<i>Kocuria carniphila</i>	1,39 – 1,66
<i>Kocuria marina</i>	1,72 – 1,95
<i>Kocuria marina</i>	1,63 – 1,79
<i>Kocuria rhizophila</i>	1,89 – 2,24
<i>Kocuria rhizophila</i>	1,85 – 2,06
<i>Kocuria rhizophila</i>	1,99 – 2,04
<i>Pseudomonas putida</i>	2,35 – 2,37
<i>Pseudomonas putida</i>	2,29 – 2,34
<i>Pseudomonas putida</i>	2,27 – 2,30
<i>Staphylococcus equorum</i>	2,02 – 2,11
<i>Staphylococcus equorum</i>	2,05 – 2,05
<i>Staphylococcus equorum</i>	2,01 – 2,02
<i>Staphylococcus hominis</i>	1,95 – 2,10
<i>Staphylococcus hominis</i>	1,98 – 2,08
<i>Staphylococcus hominis</i>	1,97 – 2,08
<i>Staphylococcus warneri</i>	2,09 – 2,14
<i>Staphylococcus warneri</i>	1,91 – 1,97
<i>Staphylococcus warneri</i>	1,93 – 1,94
<i>Wautersiella falsenii</i>	1,63 – 1,79
nicht identifizierbar (<i>n</i> = 4)	<1,70

*Wertebereich (Bruker Daltonik MALDI Biotyper):
 2,00–3,00 = sehr wahrscheinliche Identifikation
 1,70–1,99 = wahrscheinliche Identifikation
 0,00–1,69 = keine Identifikation möglich

Insgesamt wurden 39 unterschiedliche Kolonien aus Blut- und Plate Count Agar mit MALDI-TOF MS untersucht. 28 Kolonien konnten bis zur Spezies-Ebene identifiziert werden. Am häufigsten wurden die Gattungen *Staphylococcus* und *Kocuria* mit je neun identifizierten Bakterientypen detektiert, gefolgt von *Pseudomonas* und *Corynebacterium*.

Campylobacter spp., insbesondere *C. jejuni*, wurden auf den untersuchten Eiern nicht nachgewiesen.

5.2 DNA-Extraktionsmethode

Die verschiedenen dargestellten Methoden zur DNA-Extraktion aus Eiklar und Eidotter waren mit Schwierigkeiten verbunden, die eine erfolgreiche DNA-Extraktion verhinderten. In Tabelle 11 werden die verschiedenen Methodenvarianten den jeweils aufgetretenen Problemen gegenübergestellt. Von *C. jejuni* (DSM 4688) wurde ein McFarland-Trübungsstandard von 1,0 (ca. 3×10^8 KbE/ml) erstellt und dieser auf ca. 10^6 – 10^2 KbE/ml verdünnt. Mit diesen Verdünnungen wurden das Eiklar und der Eidotter künstlich kontaminiert und anschließend die DNA extrahiert. Die Nachweisgrenze von *C. jejuni* in der Probe wurde anhand der qPCR (siehe Abschnitt 4.5.2, ohne Standard) ermittelt.

Beim ISOLATE II Genomic DNA-Kit (Methode 1) sind Eiklar und Eidotter direkt nach der zweiten Inkubation, die bei 70 °C für 10–13 Minuten durchgeführt wurde, verklumpt. Zusätzlich kam es zu einer Verstopfung des Filtertube, sodass beim Zentrifugieren kein Durchfluss erfolgte und kein Auffangen der DNA möglich war. Beim Versuch den Eiinhalt einmalig mit PBS zu waschen, kam es trotzdem zu einer Bildung von kleinen Klumpen (Methode 2), die ebenfalls zu einer Verstopfung führte. Bei zweimaliger Waschung mit PBS (Methode 3) kam es zwar zu keiner Verklumpung mehr, allerdings konnte in der nachfolgenden qPCR keine ausreichende Nachweisgrenze erzielt werden.

Bei der CTAB-Methode (Methode 4) kam es zu einer Schichtenbildung durch die Eimasse. In diesem Fall bildete sich diese Schichtung allerdings nicht aufgrund der zu hoch gewählten Temperatur (bei diesem Vorgehen betrug sie 65 °C), sondern nach der Zugabe von 8 ml CTAB. Die Schichtung ließ sich auch mit dem anschließenden Waschen mit 350 µl Chloroform nicht auflösen, sodass es nicht möglich war, die DNA zugänglich zu machen und im nächsten Schritt mit 350 µl 2-Propanal und 1 µl Glycogen auszufällen. Daher konnten die Proben nicht der qPCR unterzogen werden.

Tabelle 11: DNA-Extraktionsmethode für *C. jejuni* im Eiklar und Eidotter, Nachweisgrenze und aufgetretene Probleme

DNA-Extraktionsmethode	Nachweisgrenze (KbE/ml)		Anmerkung/Probleme
	Eiklar	Eidotter	
1. ISOLATE II Genomic DNA-Kit	n.d.	n.d.	Verklumpung des Eiinhalts
2. ISOLATE II Genomic DNA-Kit mit PBS	$>10^5$	$>10^5$	Kleine Klumpenbildung des Eiinhalts
3. ISOLATE II Genomic DNA-Kit mit zweimaliger PBS-Behandlung	$>10^5$	$>10^5$	Keine Werte, da Nachweisgrenze nicht erreicht wurde
4. CTAB	n.d.*	n.d.*	Schichtenbildung der Eimasse
5. DNeasy Blood and Tissue Kit	10^2	10^3	DNA erfolgreich extrahiert

*n.d.= nicht durchgeführt

Im Vergleich zu den anderen Methoden war beim DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen (Methode 5) die DNA-Extraktion erfolgreich. Die Nachweisgrenze für *C. jejuni* im Eiklar und Eidotter war mit 10^2 bzw. 10^3 KbE/ml niedriger als bei den Methoden 2 und 3. Die Zugabe einer Mischung aus 2-Propanol und Hexan (1:2) statt Ethanol konnte zwar die DNA-Ausbeute für das Eiklar nicht erhöhen, verbesserte sie jedoch beim Eidotter, sodass dadurch die Nachweisgrenze um bis zu eine Log-Stufe (von 10^4 auf 10^3 KbE/ml) verbessert wurde. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen die DNA-Extraktionen mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit und der Zugabe von Ethanol für Eiklar und der 2-Propanol/Hexan für Eidotter gewählt. Da die Matrix der Eierschalensuspension nicht so komplex ist und wenig Fett und Proteine erhält, wurde hierfür dieselbe DNA-Extraktionsmethode mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit wie beim Eiklar verwendet. Die Nachweisgrenze von *C. jejuni* in der Eierschalensuspension lag bei 10^2 KbE/ml.

5.3 Spezifität und Sensitivität der qPCR für *Campylobacter jejuni*

Für die Spezifität wurden die DNA-Extrakte aller 39 Isolate der Bakterien, die von der Eierschale isoliert wurden, zuerst mit einem Universal-Primerpaar für Bakterien (8-F und 926-R) getestet, um zu bestätigen, dass die DNA erfolgreich extrahiert wurde. Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen, dass alle DNA-Extrakte vervielfältigt wurden. Die C_t -Werte (bei Cut-off 1000 Relative Fluorescence Units; RFU) lagen zwischen 14,3 und 18,6 PCR-Zyklen, was einer Keimkonzentration von ca. 10^7 KbE/ml bis 10^8 KbE/ml entspricht.

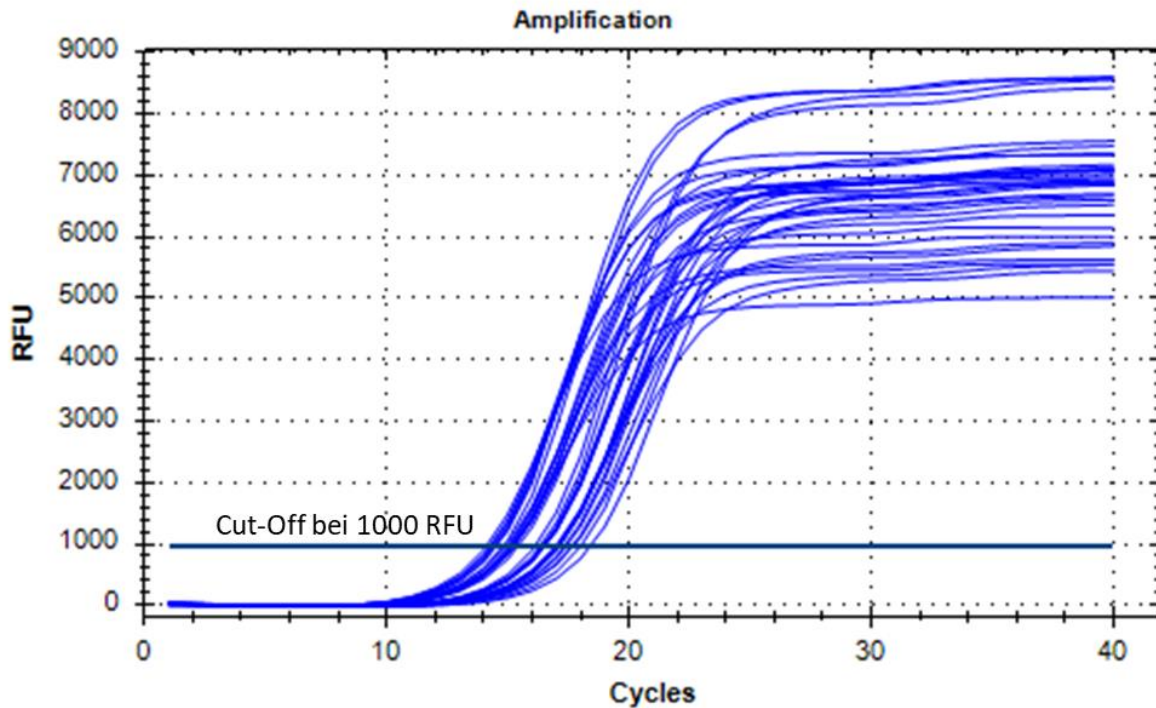


Abbildung 14: PCR-Amplifikation von 39 Isolaten der Eierschale mittels Primerpaar 8-F & 926-R

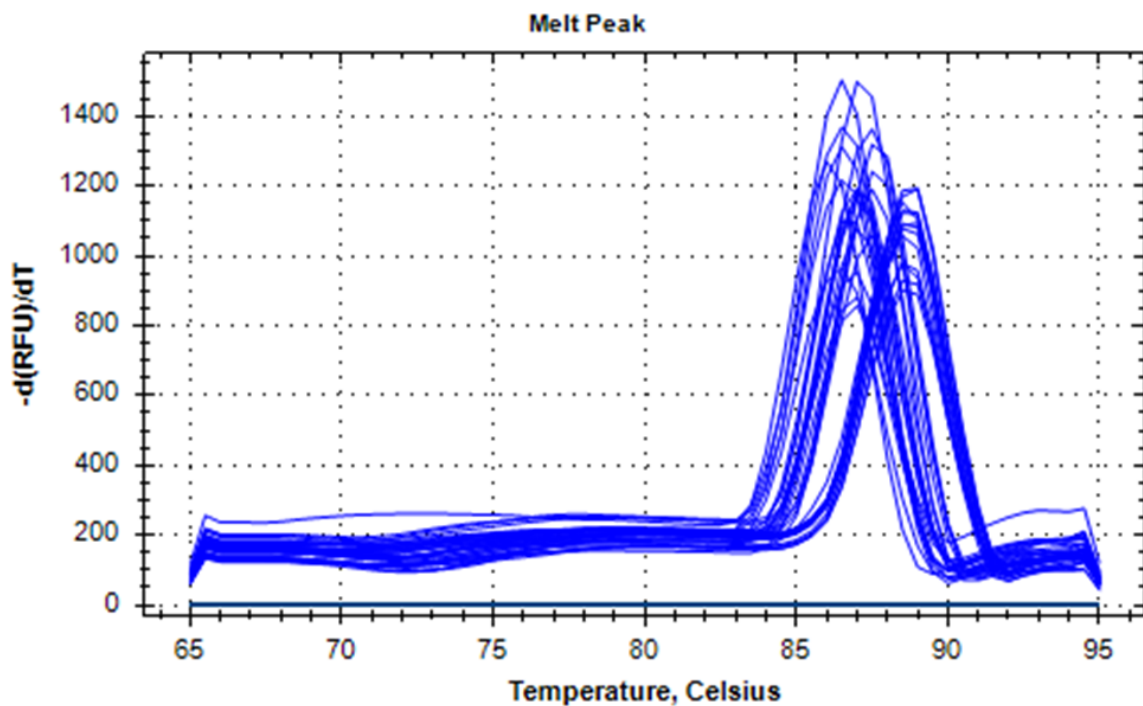


Abbildung 15: Schmelzkurven-Analyse von 39 Isolaten der Eierschale mittels Primerpaar 8-F & 926-R

Mit diesen DNA-Extrakten der 39 Isolate wurde eine qPCR für *C. jejuni* durchgeführt. Das verwendete Primerpaar (pg50 und pg3) konnte die DNA von *C. jejuni* amplifizieren (siehe Abbildung 16).

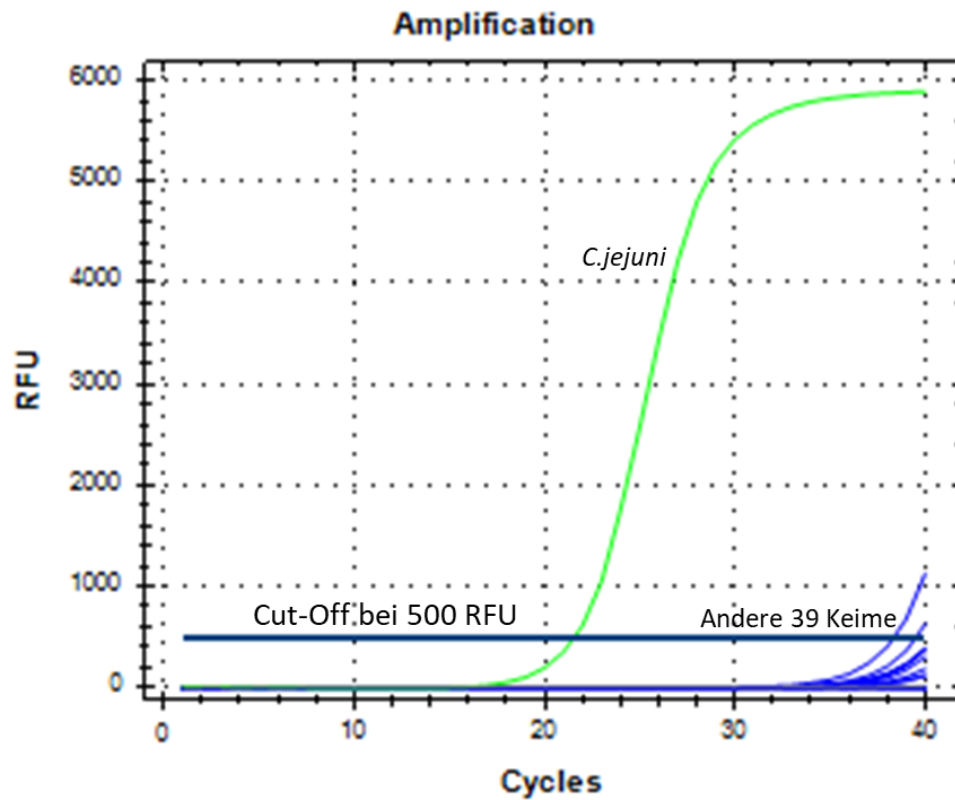
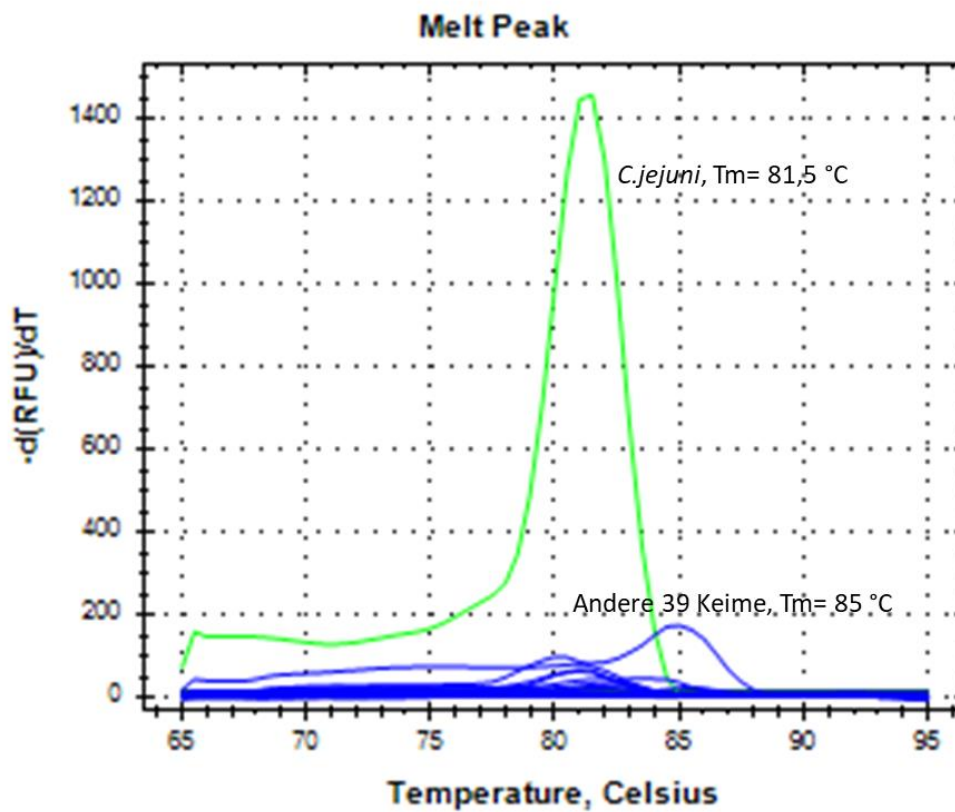


Abbildung 16: PCR-Amplifikation von *C. jejuni* mittels Primerpaar PG50 & PG3



T_m = Schmelztemperatur

Abbildung 17: Schmelzkurven-Analyse von *C. jejuni* mittels Primerpaar PG50 & PG3

Bei den anderen 39 Isolaten der Bakterien, die von der Eierschale isoliert wurden, waren die Ergebnisse negativ. Einige Bakterienspezies konnten zwar den Cut-off Value (500 RFU) erreichen, allerdings mit hohen C_t -Werten ($> 38,0$ PCR-Zyklen, was $< 10^2$ KbE/ml entspricht). Die Amplifikate dieser Bakterien konnten aber als negativ ausgewertet werden, da sich die Schmelztemperatur unterschied. Bei *C. jejuni* lag sie bei $81,5$ °C (siehe Abbildung 17). Somit konnte darauf geschlossen werden, dass das angewendete qPCR-Verfahren nur für *C. jejuni* (und nach der Literatur auch *C. coli*, Oyoyo et al. (1992)) spezifisch war. Bei den 39 untersuchten Isolaten der Eierschale wurden die Spezies nicht genauer identifiziert.

Aus den Proben wurde mittels des DNeasy Blood and Tissue Kits die DNA und anschließend die qPCR durchgeführt. Für diese waren 50 Zyklen erforderlich, um ein positives Signal zu erhalten. Tabelle 12 zeigt die durchschnittlichen C_t -Werte der Proben nach der Anpassung der qPCR (siehe Abschnitt 4.5.3). Die Nachweisgrenze liegt bei 10^2 KbE/ml für die Eierschalensuspension und das Eiklar. Allerdings erreichten die Proben des Eiklars bei gleicher Konzentration von *C. jejuni* dieselben C_t -Werte ca. 3–5 PCR-Zyklen (ca. $1,0$ – $1,5 \log_{10}$ KbE) später als die Eierschalensuspension. Die Eidotter-Proben erreichten die C_t -Werte sogar 7–9 bzw. 4–6 PCR-Zyklen (ca. $2,0$ – $2,5$ bzw. $1,0$ – $1,5 \log_{10}$ KbE) später als die Eierschalensuspension bzw. die Eiklar-Proben. Daher war *C. jejuni* in den Eidotter-Proben nur bis zu einer Konzentration von 10^3 KbE/ml nachzuweisen. Die Amplifikate von allen Proben mit positiven Signalen zeigten eine ähnliche Schmelztemperatur, die zwischen $80,0$ °C und $81,5$ °C lag.

Für die Ermittlung der C_t -Werte und der Nachweisgrenze wurden die DNA-Extrakte der Eierschalensuspension von 10^6 bis 10^2 KbE/ml *C. jejuni* als Standard für die qPCR verwendet, um *C. jejuni* in der Eierschale, im Eiklar und im Eidotter zu quantifizieren. Die durch die qPCR ermittelten Werte für die Eierschalensuspensionen (KbE/ml) wurde mit einem Verdünnungsfaktor (1:10) multipliziert, um die Werte der *C. jejuni* in KbE/g Eierschale umzurechnen. Eiklar und Eidotter erreichten die oben beschriebenen C_t -Werte bei gleicher Konzentration von *C. jejuni* jeweils um $1,0$ – $1,5$ bzw. $2,0$ – $2,5$ Log-Stufen später als die Eierschalensuspension. Deshalb wurden die von der qPCR ermittelten Werte für Eiklar und Eidotter mit dem Faktor 10 bzw. 100 multipliziert. In Tabelle 13 sowie Abbildung 18, Abbildung 19 und Abbildung 20 in den Abschnitten 5.4 und 5.6 sind die Ergebnisse nach dieser Umrechnung dargestellt.

Tabelle 12: C_t-Werte (Anzahl der PCR-Zyklen) der Proben, die mit *C. jejuni* künstlich kontaminiert wurden

Konzentration <i>C. jejuni</i> (KbE/ml)	C _t -Werte (Cut-off: 500 RFU)		
	Eischale	Eiklar	Eidotter
10 ⁶	26,0	n.d.*	n.d.*
10 ⁵	28,6	31,7(± 2,2)	37,5 (± 1,1)
10 ⁴	32,4	35,6 (± 1,3)	41,8 (± 2,1)
10 ³	35,3	39,5 (± 1,2)	44,0 (± 0,7)
10 ²	37,8	44,0 (± 1,2)	n.n.*

*n.d. = nicht durchgeführt; n.n. = nicht nachgewiesen

5.4 Übertragung der *Campylobacter jejuni* von der Schale in den Eiinhalt

Das Durchschnittsgewicht der SPF-Eier lag bei 41,85 (±1,92) g. Nach der künstlichen Kontamination der SPF-Eier und der Trennung des Eiinhalts wurde bei der Tauchsuspension, der Eierschalensuspension, dem Eiklar und dem Eidotter jeweils die DNA extrahiert und eine qPCR durchgeführt. Für die Probenarten außer der Tauchsuspension wurde zudem der kulturelle Nachweis auf *C. jejuni* versucht. Insgesamt wurden drei Durchläufe durchgeführt, jeweils mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *C. jejuni* in der Tauchsuspension. Für jede Tauchsuspension wurden zwei Eier eingetaucht. Die Menge der *C. jejuni* in der Eierschalensuspension (KbE/ml) wurde anhand des Verdünnungsfaktors auf KbE pro Gramm Eierschale (KbE/g) umgerechnet. Die Umrechnung der Anzahl der detektierten *C. jejuni* mittels qPCR und deren Standards in der Eierschalensuspension, dem Eiklar und dem Eidotter wurde wie in Abschnitt 4.5.3 beschrieben durchgeführt. Tabelle 13 zeigt die Konzentration der *C. jejuni* in den untersuchten Proben, wie sie mittels qPCR und kultureller Methode nachgewiesen werden konnten.

Die Konzentration von *C. jejuni* in der Tauchsuspension lag bei der Quantifizierung mittels qPCR zwischen 3,60 log₁₀ KbE/ml und 7,11 log₁₀ KbE/ml. Für die Proben der Eierschale konnte mittels PCR in jedem Fall die vorgenommene Kontamination mit *C. jejuni* (1,37–4,02 log₁₀ KbE/g) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Werte durchwegs niedriger lagen als die der Tauchsuspension, d. h. die Eierschale nahm nicht dieselbe Menge an Keimen auf wie in der Tauchsuspension enthalten war. Die nachgewiesene Kontamination der Schale war höher, wenn die Keimkonzentration in der Suspension erhöht wurde. Bei Durchlauf 1 enthielten die Tauchsuspensionen 3,6–4,82 log₁₀ KbE/g *C. jejuni*, wovon auf der Eierschale 1,37–2,71 log₁₀ KbE/g erneut nachgewiesen wurden. Die Tauchsuspensionen in den

Durchläufen 2 und 3 enthielten 5,49–7,11 log₁₀ KbE/ml *C. jejuni*, wovon (abgesehen von Ei „H“) ca. 3,11–4,02 log₁₀ KbE/g auf der Schale ebenfalls nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse wurden in den meisten Fällen durch den kulturellen Nachweis bestätigt. Nur in drei Fällen konnte der kulturelle Nachweis nicht erbracht werden. Die Differenz zwischen den beiden Methoden bei den anderen Proben lag innerhalb einer Log-Stufe, nämlich bei 0,2–1,2 (0,7±0,5) log₁₀ KbE/g. Daraus lässt sich ablesen, dass das Ergebnis der qPCR mit dem der kulturellen Methode vergleichbar war.

Tabelle 13: Molekularbiologischer und kultureller Nachweis der Übertragung von *C. jejuni* von der Eierschale auf den Eiinhalt

Durchlauf	Tauchsuspension (log ₁₀ KbE/ml)	Probe	Eischale (log ₁₀ KbE/g)		Eiklar (log ₁₀ KbE/ml)		Eidotter (log ₁₀ KbE/ml)	
			PCR	Kultur	PCR	Kultur	PCR	Kultur
1	4,82	A	2,71	3,46	-	-	-	-
		B	2,59	3,06	-	-	-	-
	3,60	C	2,24	2,41	-	-	-	-
		D	1,37	2,58	-	-	-	-
2	6,62	E	3,45	3,18	2,35	2,29	-	-
		F	3,50	3,34	0,71	2,38	-	-
	5,49	G	3,11	2,00	-	1,90	positiv*	-
		H	1,89	-	1,68	1,67	1,67	-
3	7,11	I	4,02	2,78	3,80	2,04	2,05	-
		J	3,82	2,60	3,62	1,37	-	-
	5,83	K	3,45	-	2,28	-	-	-
		L	3,25	-	2,35	0,82	-	-

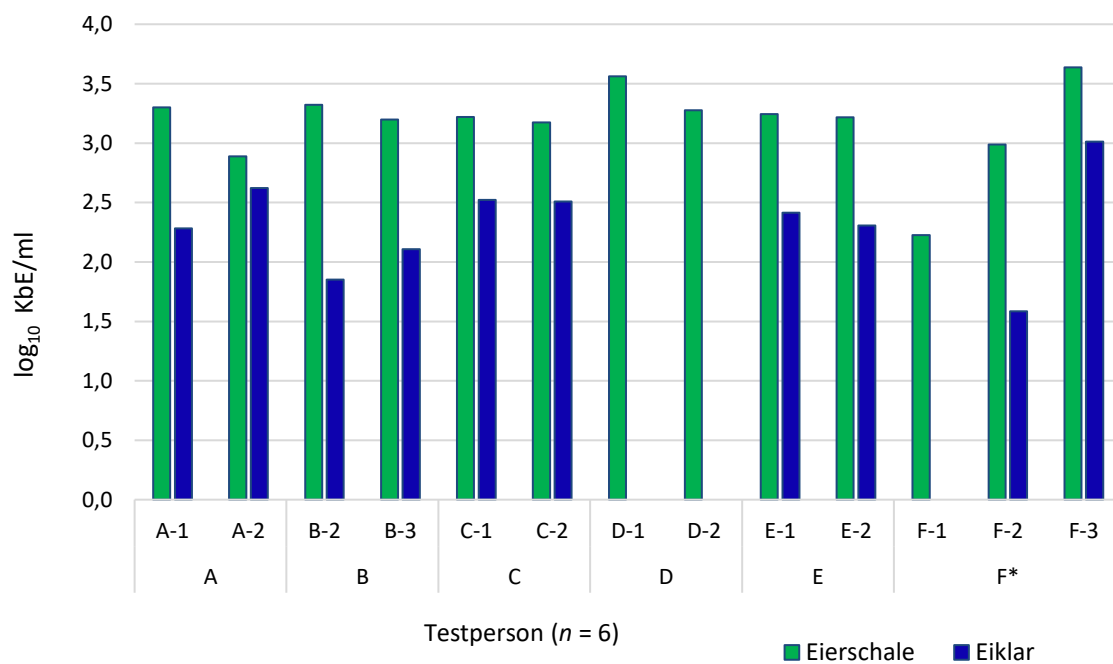
*positiv: Signal der Amplifikation vorhanden, aber unterhalb des festgelegten RFU-Cut-Offs (500 RFU), daher nicht zur Berechnung verwendet

Im Eiklar konnte in sieben der zwölf Proben mittels PCR eine Kontamination mit *C. jejuni* nachgewiesen werden. In allen Fällen lag die Konzentration der Keime im Eiklar (0,71–3,80 log₁₀ KbE/ml) unterhalb des zugehörigen Werts auf der Eierschale. Der kulturelle Nachweis konnte im Eiklar ebenfalls bei sieben der zwölf Proben erbracht werden (0,82–2,38 log₁₀ KbE/ml). Auch beim Eiklar zeigte sich, dass eine höhere Konzentration der *C. jejuni* in der Eierschale mit einer höheren Keimkonzentration im Eiklar einherging. Die Differenz zwischen den beiden Methoden, die bei 0,0–2,3 log₁₀ KbE/ml lag, war allerdings höher als bei der Eierschale.

Beim Eidotter konnten in der PCR in drei Proben *C. jejuni* nachgewiesen werden. Die Konzentration lag in diesen Fällen bei < 2,05 log₁₀ KbE/ml und somit zwar erneut niedriger als

in der Eierschale, aber ähnlich hoch wie im Eiklar. Kulturell konnte in keinem der zwölf Fälle der Nachweis erbracht werden, dass *C. jejuni* im Eidotter vorhanden waren.

Mit diesem Versuch wurde nachgewiesen, dass *C. jejuni* auf der Eierschale durch die Trennung des Eiinhalts in das Eiklar und den Eidotter übertragen werden können. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die kulturelle Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von *C. jejuni* auf der Eierschale, im Eiklar und im Eidotter durch die molekularbiologische Methode ersetzt werden kann.



*Durchschnittswerte der drei Durchläufe in Tabelle 13 (hier als F-1, F-2 und F-3 bezeichnet)

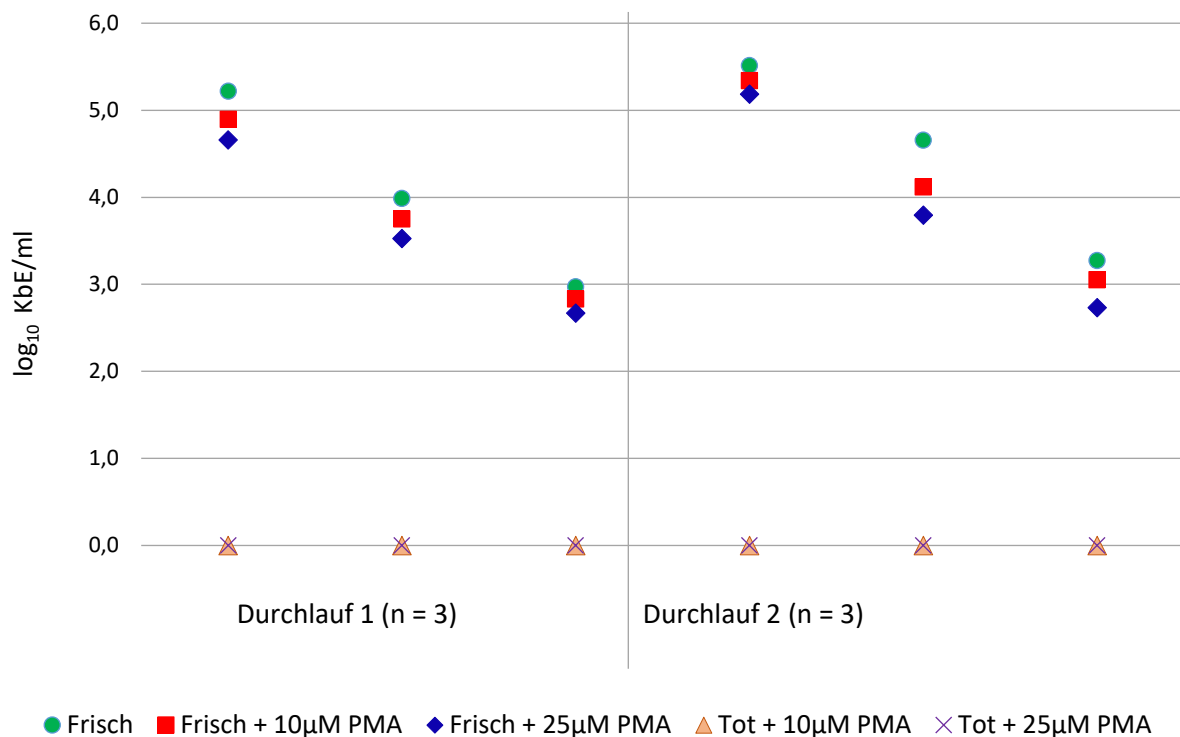
Abbildung 18: Übertragung der *C. jejuni* von der Eierschale (KbE/g) auf das Eiklar (KbE/ml) bei fünf Testpersonen

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die bisher dargestellten Ergebnisse mit den Ergebnissen der fünf weiteren Personen verglichen. In der Tauchsuspension der Versuchspersonen (A, B, C, D und E) wurden mittels PCR *C. jejuni* in einer Konzentration von 4,0 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen. Abbildung 18 stellt dar, wie viele *C. jejuni* in der Eierschalensuspension und im Eiklar nachgewiesen wurden. Zum Vergleich sind die Mittelwerte der drei Durchläufe aus Tabelle 13 ebenfalls dargestellt (Person F). In der Eierschalensuspension lagen *C. jejuni* in einer Konzentration von 3,0–3,5 log₁₀ KbE/g vor. Bei allen bis auf einer Testperson (Person „D“) wurden bei der Trennung des Eiinhalts *C. jejuni* von der Eierschale in das Eiklar übertragen. Die nachgewiesenen *C. jejuni* im Eiklar wiesen eine

Konzentration von 1,8–2,6 KbE/ml auf. Im Eidotter konnten in keiner Probe *C. jejuni* nachgewiesen werden. In den Proben der Negativkontrolle konnten in keinem Fall auf der Eierschale, im Eiklar oder im Eidotter *C. jejuni* durch die PCR bestätigt werden. Dies zeigt, dass eine Kreuzkontamination zwischen den Proben während des Tests nicht stattgefunden hat.

5.5 Auswahl der PMA-Konzentration

Für die Auswahl wurden zwei PMA-Endkonzentrationen (10 μM vs. 25 μM) getestet und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der beiden PMA-Konzentrationen sind in Abbildung 19 dargestellt. Die Konzentration von *C. jejuni* in den Proben wurden mittels qPCR und dem zusätzlich zugefügten Standard für die Quantifikation des Zielkeims ermittelt.



Bei den toten Kulturen mit 10 μM und 25 μM PMA zeigte die PCR-Amplifikation kein Signal

Abbildung 19: Vergleich zwischen zwei PMA-Konzentrationen bei frischen und toten *C. jejuni*-Kulturen mittels PMA-qPCR

Die Abbildung zeigt in beiden Durchläufen und unabhängig von der Konzentration von *C. jejuni* in der Tauchsuspension ein sehr ähnliches Ergebnis. Die qPCR weist für die frische *C.-jejuni*-Kultur ohne PMA den höchsten Wert (\log_{10} KbE/ml) auf. Bei Zugabe von 10 μM bzw. 25 μM PMA konnte bei der frischen *C.-jejuni*-Kultur jeweils eine um 0,33 ($\pm 0,13$) \log_{10} KbE/ml bzw. 0,56 ($\pm 0,21$) \log_{10} KbE/ml geringere Konzentration nachgewiesen werden. Die Zugabe von

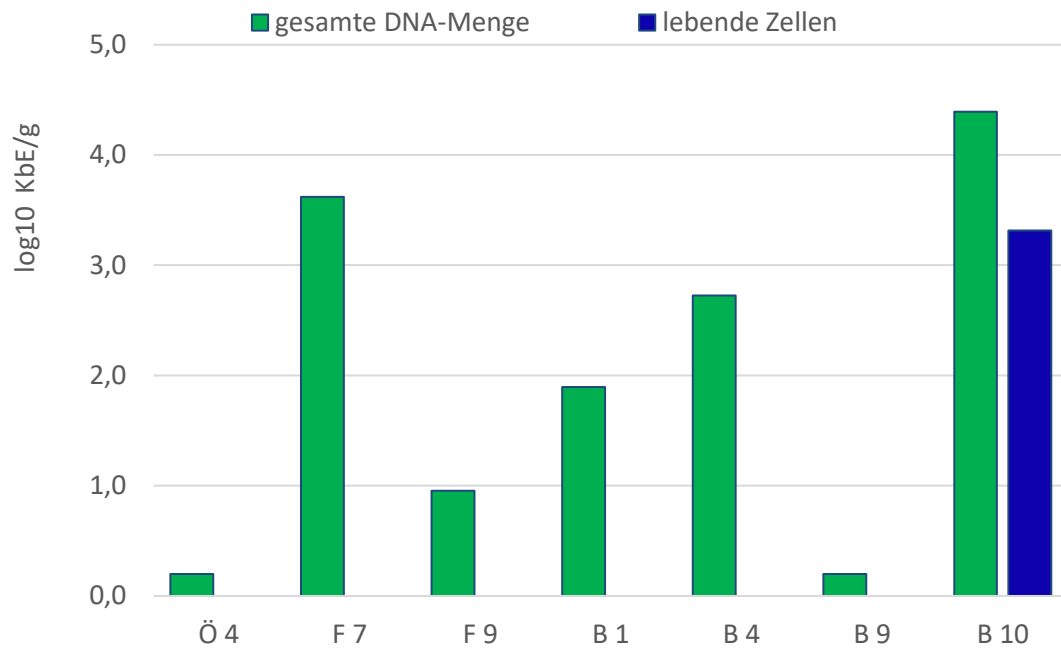
PMA in den untersuchten Mengen wirkt sich unabhängig von der zugegebenen Menge auf die qPCR-Ergebnisse der lebenden Keime nur geringfügig aus. Für die tote *C.-jejuni*-Kultur ($< 10^5$ KbE/ml) wurde bei Zugabe von PMA keine DNA vervielfältigt. Das bedeutet, dass sowohl die PMA-Konzentration von 10 μ M als auch die Konzentration von 25 μ M die qPCR-Amplifikation von toten *C. jejuni* komplett unterdrücken konnte. Daher wurde die geringere Endkonzentration von 10 μ M PMA für die weiteren Untersuchungen verwendet.

5.6 Eier aus dem Handel

Eier aus dem Handel wurden mittels PMA-qPCR auf *Campylobacter* spp. (in diesem Fall *C. jejuni* und *C. coli*) auf der Eierschale untersucht. Das verwendete Primerpaar amplifiziert die DNA von *C. jejuni* und *C. coli*, sodass bei der DNA beider Stämme ein positives Signal detektiert werden kann.

Von 30 Proben aus dem Handel waren 23 negativ. Auf insgesamt sieben wurde eine Kontamination mit *Campylobacter* spp. nachgewiesen (23,3 % der getesteten Proben, siehe Abbildung 20). Die Konzentration von *Campylobacter* spp. für die Quantifikation der Zielkeime in den Proben wurde mittels qPCR und zugefügtem Standard (*C. jejuni*) ermittelt. Von den sieben positiv getesteten Proben stammte eine aus der Ökohaltung, zwei stammten aus der Freilandhaltung und vier aus der Bodenhaltung. Die Konzentration in der positiv getesteten Probe aus der Ökohaltung betrug 0,20 \log_{10} KbE/ml. Bei den Eiern aus Freilandhaltung wiesen die zwei positiven Proben *Campylobacter* spp. in einer Konzentration von 0,96 \log_{10} KbE/ml bzw. 3,62 \log_{10} KbE/ml auf. Bei den positiv getesteten Proben aus der Bodenhaltung lag die Konzentration zwischen 0,20 \log_{10} KbE/ml und 4,39 \log_{10} KbE/ml.

Bei einer Probe aus der Bodenhaltung (B 10) wurde nach der Zugabe von PMA ein positives PCR-Signal ermittelt (d. h. bei 3,3 % aller getesteten Proben). Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um *Campylobacter* spp. handelte, die eine intakte Zellwand besaßen, sodass der Farbstoff PMA nicht durch die Bakterienwand diffundieren und sich an die DNA lagern konnte. Die Konzentration von *Campylobacter* spp. in dieser Probe lag bei 3,32 \log_{10} KbE/ml.



n = 7/30; Ö = Ökohaltung; F = Freilandhaltung; B = Bodenhaltung

Abbildung 20: Positiv auf *Campylobacter* spp. getestete Eierproben aus dem Einzelhandel, ermittelt mittels PMA-qPCR

6 Diskussion

6.1 Mikrobiota auf Eiern

Bei der Untersuchung der Mikrobiota auf den SPF-Eiern wurden in dieser Arbeit mehrere Bakteriengattungen identifiziert. Dazu zählen *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Wautersiella*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* und *Klebsiella*) und *Staphylococcus*. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit denen von bereits früher publizierten Studien überein. In einer Studie aus dem Jahr 2018 wurden aus verschiedenen Einzelhandelsmärkten in Dhaka (Bangladesch) Eierproben untersucht und festgestellt, dass vor allem *E. coli* und *Staphylococcus* vorkommen, gefolgt von *Salmonella* und *Pseudomonas* (Islam, 2018). Auch bei einer Untersuchung in Thailand im Jahr 2015 wurde eine Kontamination der Eierschale mit *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Serratia* nachgewiesen (Chaemsanit et al., 2015). Musgrove et al. (2004) untersuchten das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* auf der Eierschale von 72 ungewaschenen und 72 gewaschenen Eiern und stellten auf den ungewaschenen Eiern ebenfalls am häufigsten *Escherichia* oder *Enterobacter* fest, allerdings auch Vertreter anderer Gattungen wie *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Salmonella* und *Yersinia* (Musgrove et al., 2004).

Als Kontaminationsquelle für die Bakterien auf der Eierschale kommen vor allem Kontakte mit dem Kot sowohl in der Kloake als auch nach dem Legen infrage (Parisi et al., 2015). Weitere mögliche Quellen sind die Hygiene der Tierhaltung, die Lüftung, die Art des Bodens, Kontakte zu anderen Tierarten und die Hygiene des Personals (Shane, 1992; Pearson et al., 1993; Young et al., 2007; Igwaran und Okoh, 2019). Auch die Haltungsform wie Käfig-, Boden- oder Freilandhaltung beeinflusst das Vorkommen von Keimen (De Reu et al., 2005; Shi et al., 2020). Wegen der verschiedenen optimalen Temperaturbereiche der Bakterien sind unterschiedliche Witterungsbedingungen ebenfalls zu nennen. Auch die hygienischen Unterschiede zwischen Märkten und dem Einzelhandel sind ein Faktor. Diese stehen in einem direkten Zusammenhang mit den verwendeten Eierkisten, den Verpackungen der Eier und der Lagerungsmethode (Bruce und Drysdale, 1994). Die in dieser Arbeit untersuchten Eier stammen aus einem SPF-Betrieb der tierärztlichen Fakultät der LMU München mit stark

kontrollierten Haltungsbedingungen (siehe Abschnitt 4.2). Die Abholung, der Transport und die Lagerung erfolgten unter strengen hygienischen Maßstäben. Diese Faktoren könnten ein Grund für eine niedrigere Diversität als in den zitierten Studien sein. In dieser Studie wurden am häufigsten die Gattungen *Staphylococcus* und *Kocuria* mit je neun identifizierten Arten detektiert, gefolgt von *Pseudomonas* und *Corynebacterium*. Mit der qPCR konnte belegt werden, dass die für die Untersuchung verwendeten SPF-Eier frei von *Campylobacter* spp. waren.

6.2 Überprüfung der DNA-Extraktionsmethoden

Für die erfolgreiche Durchführung der Untersuchungen in dieser Arbeit wurde eine DNA-Extraktionsmethode für den Eihalt entwickelt. Bei Extraktionsprotokollen müssen Komponenten wie Fette, Zucker, Proteine etc. eliminiert werden, um eine Störung der nachfolgenden PCR zu verhindern (Bernardo et al., 2007). Dabei wurden DNA-Extraktionen nach gängiger Methode mit Homogenisierung der Proben und anschließender Lyse angewandt.

Ein Ei ist außen von einer Cuticula, der Eierschale und zwei Eihäuten umgeben. Im Inneren befinden sich das Eiklar und der Eidotter mit der Dottermembran. Die äußere kalkhaltige Schale macht etwa 10 % des Gewichtes aus. Der Rest besteht zu zwei Dritteln aus Eiklar und einem Drittel aus Eidotter (Grashorn, 2021). Die Zusammensetzung dieser beiden Komponenten ist sehr unterschiedlich. Während das Eiklar zu 87 % aus Wasser besteht, macht der Wasseranteil beim Eidotter nur 50 % aus. Der Proteinanteil beim Dotter beträgt ungefähr 16 %, beim Eiklar etwa 11 %. Der Fettgehalt des Eiklars ist mit unter 1 % zu vernachlässigen, während er beim Eidotter fast ein Drittel (32 %) der Masse ausmacht (Grashorn, 2021). Der Kohlenhydratanteil ist mit unter 1 % sowohl im Eiklar als auch im Eidotter sehr gering. Auch Mineralstoffe machen nur einen geringen Prozentanteil aus, beim Eiklar 0,7 % und beim Eidotter 1,7 % (Grashorn, 2021).

Diese Zusammensetzung des Eis erschwert die DNA-Extraktion. Vor allem Proteine können als PCR-Inhibitoren wirken und zu falsch-negativen Ergebnisse der PCR führen (He et al., 2007). Zu diesen Inhibitoren zählen Chelatoren von Kationen, die die DNA-Polymerase während des PCR-Zyklus abbauen oder binden. Dies resultiert in einer verringerten Amplifikation der DNA.

Zusätzlich enthält das Flüssigei Proteine wie Lysozym, Proteasen, Proteaseinhibitoren und Bindungsproteine (Belitz, 2008).

Da demnach die Qualität der extrahierten DNA unmittelbar von der Extraktionsmethode abhängt, wurde in dieser Arbeit versucht, die unterschiedlichen Inhibitoren so auszuwaschen, dass sie einen möglichst geringen Einfluss auf die PCR ausüben konnten. Zunächst wurde die Extraktion mit einem am Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit hergestellten und erfolgreich bei Fleischerzeugnissen (Bahlinger et al., 2020) angewandten Kit, dem ISOLATE II Genomic DNA-Kit (Bioline), durchgeführt. Bei Anwendung dieses Kits (Methode 1) denaturierte der Eiinhalt nach der Inkubation bei 70 °C, was die Durchführung der weiteren Prozessschritte erschwerte. Um der Verklumpung durch denaturierte Ei-Proteine vorzubeugen, wurde der Eiinhalt auf einer hohen Geschwindigkeit abzentrifugiert (Methode 2). Der Proteine und Fett enthaltende Überstand wurde verworfen und das Pellet einmalig mit PBS gewaschen. PBS ist eine Pufferlösung, die Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid und Kaliumhydrogenphosphat enthält. Dieser Puffer ermöglicht ein Arbeiten bei einem konstanten pH-Wert und konstanten osmotischem Druck (Sambrook et al., 1989). Nach der Inkubation bei 70 °C wurden wieder Verklumpungen festgestellt, die vermutlich auf die noch vorhandenen Proteine im Eiinhalt zurückzuführen waren. Als Folge wurde der Filtertube erneut verstopft und dadurch das Auffangen der DNA in der Silica-Membran verhindert. Um die Proteine vollständig aus dem Eiinhalt zu entfernen, wurde eine zweimalige Waschung mit PBS durchgeführt (Methode 3). Da dadurch die Proteine fast komplett entfernt wurden, kam es zwar zu keiner Verklumpung, allerdings auch zu keiner PCR-Amplifikation. Dieses deutet darauf hin, dass die DNA von *Campylobacter* spp. entweder nicht isoliert wurde oder die PCR-Amplifikation durch Inhibitoren verhindert wurde.

Zur Umgehung dieses Problems wurden im Folgenden weitere Methoden gewählt, die in der Literatur bereits zur DNA-Extraktion angewendet wurden. Zunächst wurde eine modifizierte Version der CTAB-Methode von Nemeth et al. (2004) verwendet (He et al., 2007). Dabei wurde die DNA durch Zentrifugation zur Schichtenbildung gebracht, die anschließend mit 350 µl NaCl und 350 µl Chloroform gelöst werden sollte (He et al., 2007). Dieser Lösungsschritt funktionierte allerdings, wie die Ergebnisse zeigen, nicht. Die Ursache hierfür ist unklar.

Schließlich wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen (Methode 5) angewandt. Das Kit ermöglicht nach Angabe des Herstellers die DNA-Isolierung aus Blut, Zellen, Gewebe sowie

Bakterien, Hefen und anderen schwer zu lysierenden Proben. Die genomische DNA wird mit hoher Ausbeute und Reinheit extrahiert und anschließend mit einer qPCR vervielfältigt.

Die Zusammensetzung des Blutes weist Parallelen zu der des Eis auf. Blut besteht aus Plasma und einem zellulären Anteil. Das Plasma macht ca. 55 % des Volumens aus und der zelluläre Anteil ca. 45 %. Die Zusammensetzung des Plasmas besteht zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus Proteinen, niedermolekularen Stoffen und Elektrolyten. Der zelluläre Anteil setzt sich aus 99 % Erythrozyten und insgesamt 1 % Thrombozyten und Leukozyten zusammen (Rassow et al., 2016). Da Blut und Eiinhalt ähnliche Komponenten enthalten, wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit für die DNA-Extraktion des Eiinhalts in dieser Studie verwendet.

In der vorliegenden Studie zeigte das Kit das beste Ergebnis im Vergleich zu den oben genannten Methoden. Die Matrix des Eidotters hatte allerdings einen negativen Einfluss auf die PCR-Amplifikation, was auch bereits früher festgestellt wurde (He et al., 2007). Daher wurde die Vorgehensweise für den Eidotter nochmals abgeändert, um die DNA-Ausbeute weiter zu erhöhen. Aufgrund des hohen Fettgehalts des Eidotters wurden anstatt Ethanol 600 µl einer Mischung von 2-Propanol und Hexan (Volumenverhältnis 1:2) gewählt (Kovalcuks und Duma, 2014). Bei 2-Propanol handelt es sich um einen zweiwertigen Alkohol, der reaktionsfreudiger ist als der einwertige Alkohol Ethanol. 2-Propanol ist ein polares Lösungsmittel, das in der Lage ist, die Eidotterproteine zu denaturieren und polare Lipide zu extrahieren. Gleichzeitig ist es auch ein unpolares Lösungsmittel, dass gut mit einem weiteren unpolaren Lösungsmittel wie Hexan in Lösung gehen kann. Außerdem ist 2-Propanol wenig toxisch und als Lösungsmittel für die Verarbeitung von Lebensmitteln anerkannt (EFSA, 2005). Hexan gilt ebenfalls als gutes Lösungsmittel für die Lipidextraktion, vor allem für Triglyceride. Das beste Mischungsverhältnis von 2-Propanol und Hexan wird mit einem Verhältnis von 30:70 angegeben. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass ein zu hoher Anteil an 2-Propanol das Lösungsmittel zu polar werden lässt und die neutralen Lipide wie Triglyceride somit schlechter extrahiert werden können (Kovalcuks und Duma, 2014).

Die Ergebnisse der DNA-Extraktion mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit waren sowohl für das Eiklar als auch für den Eidotter zufriedenstellend. Auch für die DNA-Extraktion der Eierschalensuspension konnte das DNeasy Blood and Tissue Kit verwendet werden. Diese Suspension wies deutlich weniger störende Faktoren wie Proteine und Lipide auf. Somit zeigten sich in der anschließenden qPCR verwertbare Ergebnisse.

6.3 Übertragung der *Campylobacter jejuni* von der Schale in den Eiinhalt

Die bestehende Literatur misst Eiern als Kontaminationsquelle in Bezug auf die humane Campylobakteriose nur eine geringe Bedeutung bei. In einem Modell von Pires et al. (2010), das auf Daten der EFSA basiert, wird Eiern ein sehr geringer Anteil (1,30 %) an den 2005 und 2006 in Europa aufgetretenen Ausbrüchen von Campylobakteriose zugeschrieben. Im Zoonose-Bericht der EFSA über die Ausbrüche von 2010–2017 werden Eier und Eierprodukte lediglich für 0,4 % der humanen Infektionen als sehr wahrscheinliche Ursache genannt (EFSA, 2019). Eine 2012 durchgeführte Modellierung zur Zuordnung von Infektionsquellen zu lebensmittelassoziierten Ausbrüchen von Campylobakteriose in den USA kommt zu dem Ergebnis, dass die Ausbrüche in keinem Zusammenhang mit Eiern stehen (Batz et al., 2012). In einer weltweiten Analyse für den Zeitraum 1988–2007 wird der Ausbruch der Campylobakteriose nur in 1,6 % der Fälle auf Eier zurückgeführt (Greig und Ravel, 2009).

Diese Aussagen scheinen in einem gewissen Widerspruch zu den Zahlen zu stehen, die in dieser Arbeit festgestellt wurden. Wenn die Übertragungsmöglichkeit von der Eierschale in den Eiinhalt betrachtet wird, so ist es im Fall einer hohen Keimbelastung der Schale sogar wahrscheinlich, dass beim Aufschlagen und Trennen von Eiklar und Eidotter *C. jejuni* in den Eiinhalt gelangen und somit ein Kontaminationsrisiko darstellen. Die künstlich auf die Eierschale aufgebrachte Konzentration von *C. jejuni* war in dieser Studie relativ hoch und dadurch die Übertragung der Keime in den Eiinhalt während der Trennung, vor allem in das Eiklar, entsprechend wahrscheinlich. Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen konnten *C. jejuni* mittels qPCR in einer Konzentration von 1,37–4,02 log₁₀ KbE/g auf der künstlich kontaminierten Eierschale nachgewiesen werden. Im Eiklar wurde nach der Trennung eine Konzentration von 0–3,80 log₁₀ KbE/ml detektiert. Demnach ist ein großer Anteil der Keime von der Eierschale ins Eiklar übertragen worden. Die relativ hohe Spannweite der Konzentration beim Eiklar ist wahrscheinlich auf die Homogenisierung mittels steriler Pipettenspitzen zurückzuführen, die eine zufällige Schwankung zulässt. Dadurch waren manche Proben des Eiinhalts stark mit *C. jejuni* kontaminiert, während in anderen Proben *C. jejuni* nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Problematik ist in der Realität jedoch zu vernachlässigen, da der Verbraucher üblicherweise das gesamte Eiklar verarbeitet. Ein SPF-Ei in dieser Studie wog im Durchschnitt 41,85 g, der Eiklaranteil betrug demnach ca. 25 g. Nach dieser näherungsweise Berechnung könnten *C. jejuni* (im Durchschnitt betrug die Konzentration 2,0 log₁₀ KbE/ml Eiklar) mit bis zu 2,5 x 10³ KbE/ml das gesamte Eiklar

kontaminieren. Dadurch, dass bereits 500–800 Bakterien von *Campylobacter* spp. zu einem Ausbruch der Erkrankung führen können (Robinson, 1981; Black et al., 1988), ist nach den vorliegenden Ergebnissen die Möglichkeit der Infektion durch kontaminierten Eiinhalt nach Trennung und Verzehr roheihaltiger Speisen definitiv gegeben. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Eier aus dem Handel ist lediglich eine von 30 Eierchargen mit einer ähnlich hohen Zahl mit lebenden *Campylobacter* spp. ($3,32 \log_{10}$ KbE/g) belastet wie die künstlich kontaminierten Eier (siehe Abschnitt 5.4).

Die Methode der Trennung mittels der Schale wird von Verbrauchern häufig angewendet. Es gibt jedoch auch spezielle Vorrichtungen, die die Trennung durch einfaches Aufschlagen und anschließendes Ausgießen des Eis ermöglichen. Hierbei kommt der Eiinhalt so gut wie gar nicht mit der äußeren, möglicherweise kontaminierten Schale in Berührung. Die industrielle Trennung von Eiern in Eiklar und Eidotter verläuft sogar vollständig ohne Kontakt der Eierschale mit dem Eiinhalt (Gidamak.com, 2021).

Eine wichtige Folgefrage ist die weitere Verarbeitung des Eiinhalts. Wenn der Eiinhalt dabei erhitzt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die *Campylobacter* spp. abgetötet werden. Nach vier Minuten bei einer durchschnittlichen Temperatur von 57,5 °C sinkt die Konzentration von *Campylobacter* spp. unter die Nachweisgrenze (Sampers et al., 2010). Durchgaren oder Pasteurisieren führen zu einem Absterben der *Campylobacter* spp. auch im Flüssigei (Pettrak et al., 2000; Uyttendaele et al., 2006; Humphrey et al., 2007; Nauta et al., 2009).

Demnach sind bei der Betrachtung des Kontaminationsrisikos nur die Eierprodukte von Interesse, die nicht erhitzt, gekocht oder pasteurisiert werden. Die Literatur belegt den Nachweis von *Campylobacter* spp. in nicht-pasteurisierten Eierprodukten. So wurden in einer japanischen Studie in 27,9 % der nicht-pasteurisierten, flüssigen Volleipproben und in 36 % der nicht-pasteurisierten Flüssigeidotterproben *Campylobacter* spp. isoliert. Die nachgewiesene Belastung betrug in dieser Arbeit dabei umgerechnet 0,03–2,4 KbE/ml (Sato und Sashihara, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass es beim Aufschlagen und anschließenden manuellen Trennen des Eiinhalts zu einer Kreuzkontamination von der Eierschale in den Eiinhalt kommen kann. Wie in Abschnitt 6.1 dargestellt, gilt dies nicht nur für *Campylobacter* spp., sondern auch für andere Pathogene und opportunistische Pathogene,

die sich auf der Eierschale befinden, wie zum Beispiel *Salmonella*, *Corynebacterium* und *Staphylococcus* (Musgrove et al., 2004; Chaemsanit et al., 2015; Islam, 2018).

6.4 Auswahl der PMA-Konzentration

Für die Lebend-Tot-Differenzierung der möglicherweise auf den Eiern aus dem Handel vorhandenen Bakterien wurde der Farbstoff PMA zugegeben. In der Literatur gibt es zur Auswahl der geeigneten PMA-Konzentration unterschiedliche Angaben. Dies hängt damit zusammen, dass PMA zwar für den gewünschten Effekt eine notwendige Voraussetzung ist, aber zunächst umstritten war, ob das PMA in zu hohen Konzentrationen ähnlich wie EMA auch durch intakte Bakterienwände diffundieren kann und somit das PCR-Signal von lebenden Zellen ebenfalls unterdrückt wird (Nocker et al., 2006). Eine Studie, bei der gramnegative und -positive Spezies verwendet wurden, zeigte allerdings, dass PMA in einer Konzentration von 60 μM und höher die Membran lebender, intakter Zellen nicht durchdringt und damit einen enormen Vorteil gegenüber dem zuvor verwendeten EMA bietet (Nocker et al., 2006). Mitunter wird nun eine höhere Konzentration von bis zu 100 μM empfohlen, da dadurch das PMA besser durch die nicht mehr intakten Zellwände diffundieren kann und somit das Signal toter Zellen besser unterdrückt wird (Bae und Wuertz, 2009).

Ein weiterer Effekt ist aber die mögliche Toxizität von PMA. Hierzu gibt es in der bestehenden Literatur verschiedene Angaben. Während einige Studien auf eine toxische Wirkung des Farbstoffs hindeuten (Pan und Breidt, 2007; Soejima et al., 2007; Yáñez et al., 2011) wird diese von Bae und Wuertz (2009) nicht belegt.

In der Literatur wurden verschiedene Konzentrationen von PMA zur Differenzierung toter und lebender *Campylobacter*-Zellen verwendet. In einer Studie aus dem Jahr 2019 lieferte eine Konzentration von 20 μM PMA die besten Resultate zur Unterscheidung von lebenden und toten *Campylobacter jejuni* (Lv et al., 2019). Frühere Studien zeigten ebenfalls, dass die PMA-qPCR eine effektive Möglichkeit zur Quantifizierung lebensfähiger *Campylobacter* spp. in verschiedenen Probenmatrices ist (Josefsen et al., 2010; Melero et al., 2011; Seinige et al., 2014). Die als optimale PMA-Konzentration beschriebene Menge an PMA variierte allerdings zwischen den Studien. Josefsen et al. (2010) kamen zu dem Ergebnis, dass eine PMA-Behandlung mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (entspricht 23,81 μM) zu einer kompletten Hemmung des qPCR-Signals der toten *Campylobacter* spp. führe. In einer anderen Studie aus dem Jahr 2014

wurden 47 μM und 50 μM PMA zur Detektion lebender *Campylobacter* spp. in Hühnerfleisch verwendet (Seinige et al., 2014). Der Unterschied der jeweils gewählten PMA-Konzentration könnte auf die Empfindlichkeit der Zellmembran der verschiedenen *Campylobacter*-Stämme zurückgeführt werden (Fittipaldi et al., 2012). Andere Variablen wie die Amplikongröße, das Probenmaterial, das Licht und die Photoaktivierungszeit können ebenfalls einen Unterschied zwischen verschiedenen Mengen an PMA ausmachen (Pacholewicz et al., 2013).

Aufgrund des Restrisikos von Toxizität für die Zellen, die das Ergebnis der Untersuchungen so beeinflussen kann, dass es zu falsch negativen Ergebnissen führt, wurde in der vorliegenden Arbeit eine möglichst geringe Konzentration eingesetzt. Gleichzeitig sollte die Konzentration ausreichend hoch sein, um die PCR-Amplifikation zu unterdrücken. Zusätzlich wurde die Matrix der Eierschalen nicht als komplex betrachtet, daher wurden im Vergleich zu den anderen Studien niedrige PMA-Konzentrationen (10 μM und 25 μM) getestet. Die Ergebnisse der beiden PMA-Konzentrationen bei lebenden Zellen (10^3 – 10^5 KbE/ml) lagen sehr nahe beieinander. Sie konnten die DNA toter Zellen von *Campylobacter* spp. ($< 10^5$ Zellen/ml) komplett überlagern, sodass sie nicht durch die PCR amplifiziert wurden. Wegen des nicht auszuschließenden Toxizitätspotenzials wurde daher die geringere Konzentration von 10 μM gewählt.

6.5 Vorkommen der *Campylobacter jejuni* in den Eierproben aus dem Handel

In der Literatur gibt es verschiedene Studien zur Prävalenz von *Campylobacter* spp. in Legehennen. Die Resultate unterscheiden in Abhängigkeit von Studiendesign und den untersuchten Ländern. Der Anteil der Hennen mit positivem kulturellem Nachweis variiert zwischen 35 % und 84 % (Rasschaert et al., 2007; Sulonen et al., 2007). Es gibt, wie bereits in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, verschiedene Studien, die die Prävalenz von *Campylobacter* spp. auf Eierschalen untersucht haben. Es handelt sich hierbei um kulturelle Untersuchungsverfahren. Insgesamt ist dabei eine Prävalenz zwischen 0 % und 7 % zu beobachten, wobei die USA eine Ausnahme darstellen, für die in einer Studie auf 16,8 % der Eierschalen *Campylobacter* spp. kulturell nachgewiesen wurden (Parisi et al., 2015).

Zwei Studien konnte eine Abhängigkeit zwischen der Prävalenz der *Campylobacter* spp. bei Eiern und der Haltungsform festgestellt werden. Jones et al. (2016) verglichen drei Haltungsformen: konventionelle Käfighaltung, Käfighaltung in einer bereicherten Umgebung

und die Haltung in einer Voliere. In der Volierenhaltung stand jeder Henne ungefähr die doppelte Fläche zur Verfügung wie in der konventionellen Käfighaltung. Die Ergebnisse zeigen, dass *C. jejuni* in 1,7 % der 60 Proben aus der konventionellen Käfighaltung, in 5,6 % der 71 Proben aus der angereicherten Käfighaltung und in 3,0 % der 166 Proben aus der Volierenhaltung nachgewiesen werden konnten. In einer weiteren Studie mit 120 Eiern wurden vier Haltungssysteme in Polen verglichen: Käfigbatterie, Tiefstreu-System, Freilandhaltung und Ökohaltung (Gondek et al., 2013). In zwei Haltungsformen (Tiefstreu und Freilandhaltung) konnte eine Kontamination mit *Campylobacter* spp., jeweils 13,1 % und 10,0 % der Eierproben, nachgewiesen werden.

In einer weiteren Arbeit wurden 48 Hühner unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen und dann im Alter von 16 Wochen je zur Hälfte auf Käfigbatterien und Freilandhaltung aufgeteilt (Parisi et al., 2015). Die Prävalenz von *Campylobacter* spp. auf der Schale lag bei Eiern aus der Käfigbatterie bei 7,4 %, während sie bei der Freilandhaltung 26,1 % betrug. Die Autoren führen die Differenz darauf zurück, dass die Hühner in der Freilandhaltung nach dem Legen stärker mit den Eiern in Kontakt kommen als in der Käfighaltung. Eine ähnliche Auffassung wird auch von Näther et al. (2009) vertreten.

In den zuvor beschriebenen Studien wurden der VBNC-Status und tote Keime nicht erfasst. In der vorliegenden Arbeit wurden 30 Eier-Packungen von drei Haltungsformen (jeweils zwei Legehennen-Betriebe) aus verschiedenen Supermärkten mittels PMA-qPCR auf *Campylobacter* (*C. jejuni* / *C. coli*) untersucht. Die Keime wurden mittels PMA-qPCR bei sieben der 30 Packungen bzw. Legehennen-Betrieben (23,3 %) auf der Eierschale nachgewiesen. Davon wurde bei einer Packung (3,3 %) aus Bodenhaltung mittels PMA-qPCR lebende *Campylobacter* spp. nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liegen im gleichen Bereich wie bei den oben genannten Studien (Gondek et al., 2013; Parisi et al., 2015; Jones et al., 2016). Die einzige Probe, die lebende Keime enthielt, stammte aus der Bodenhaltung. Bei dieser Haltungsform haben die Hennen weniger Platz und dadurch nach dem Legen häufiger Kontakt zu den Eiern. Die Eier von Legehennen aus der Ökohaltung hingegen waren weniger häufig mit *Campylobacter* spp. belastet als bei den anderen beiden Haltungsformen. Die Anforderungen an diese Haltungsform sind durch die Richtlinien der Europäischen Union, EU-Verordnung Nr. 834/2007 (Öko-Verordnung), strikter. In der Freilandhaltung in Deutschland haben die

Legehennen neben dem Stall, der den Anforderungen an die Bodenhaltung entspricht, zusätzlich tagsüber uneingeschränkten Auslauf ins Freie von 4 m² pro Henne (Zentralverband der Deutschen Geflügelwirtschaft, 2021). Die konventionelle Käfigbatteriehaltung, die in einigen der früheren Studien untersucht wurde, ist in Deutschland seit dem 01. Januar 2010 aus Tierschutzgründen verboten (Deutscher Bundestag, 2013).

Im Gegensatz zu anderen Ländern werden Eier in den EU-Mitgliedsstaaten auf dem Weg vom Legebetrieb zum Verbraucher weder gewaschen noch desinfiziert. Nach einem Beschluss der Europäischen Kommission ist das Waschen von Eiern in der EU verboten (EU-Verordnung Nr. 589/2008). Hingegen werden zum Beispiel in den USA, Kanada, Australien und Japan Eier routinemäßig gewaschen (Hannah et al., 2011; Leleu et al., 2011). Das Waschen reduziert das Risiko, dass Eier durch äußere Kontamination verderben (Hutchison et al., 2004; De Reu et al., 2006). Das Verbot des Waschens von Eiern in fast allen EU-Ländern beruht auf der Befürchtung, dass ein Befeuchten oder Waschen von Eiern vor der Lagerung etwa durch Beschädigung der Cutikula der Verderb der Eier erhöhen kann (Bagley und Christensen, 1991; Wang und Slavik, 1998; Hutchison et al., 2003; Leleu et al., 2011). Eine Untersuchung zeigt jedoch, dass das Waschen des Eis keinen Einfluss auf die Dichte und Dicke der Cutikula hat (Leleu et al., 2011). Gegen das Waschen spricht, dass in der EU die Erzeuger aufgefordert werden, die Hygienekonzepte zu erfüllen, um so die Keimbelastung im Stall der Legehennen so gering wie möglich zu halten. Wenn die Eier nach der Erzeugung im Verarbeitungsbetrieb gewaschen oder desinfiziert würden, könnte dies dazu führen, dass die Hygienebedingungen in den Aufzuchtbetrieben und Haltungsbetrieben vernachlässigt werden.

Die vergleichsweise geringe Belastung der in dieser Arbeit untersuchten Supermarkt-Eier mit lebenden *Campylobacter* spp. ist ein erster Hinweis darauf, dass das Kontaminationsrisiko gering ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es beim Aufschlagen und besonders beim anschließenden Trennen des Eiinhalts zu einer Übertragung von *Campylobacter* spp. kommen kann. Wie die Ergebnisse der PMA-qPCR zeigen, wurden 3,32 log₁₀ KbE/g lebende *Campylobacter* spp. in einer Eier-Packung aus der Bodenhaltung nachgewiesen. Für eine Kontaminierung des Eiklars und das Auslösen der Campylobakteriose sind diese Keimzahlen ausreichend (Robinson, 1981; Black et al., 1988). Daher kann das manuelle Trennen des Eiinhalts durch wiederholtes Hin- und Herlaufen lassen ein Risiko sein. Die mit Pathogenen kontaminierten Eier stellen dennoch kein Gesundheitsrisiko dar, falls sie nach der Trennung

erhitzt werden, allerdings besteht eine Gefahr für die Gesundheit, wenn der Eiinhalt für roheihaltige Produkte weiterverwendet wird.

7 Zusammenfassung

Die durch *Campylobacter jejuni* verursachte Campylobakteriose ist die häufigste bakterielle lebensmittelassoziierte Durchfallerkrankung beim Menschen. Die Übertragung der Keime durch nicht ausreichend gegartes Geflügelfleisch, Schweine- und Rindfleisch sowie nicht-pasteurisierte Milch ist hinreichend dokumentiert. Auch Eier könnten eine derartige Infektionsquelle darstellen, wenn beim Aufschlagen und manuellen Trennen des Eihalts auf der Eierschale vorhandene *Campylobacter* spp. in den Eihalt übertragen werden.

In dieser Arbeit wurden Challengeversuche durchgeführt, bei denen SPF-Eier künstlich mit verschiedenen Konzentrationen von *C. jejuni* belastet wurden. Nach der Trennung des Eihalts wurden Eierschale, Eiklar und Eidotter mittels kultureller und molekularbiologischer Methoden untersucht. Für den Nachweis der Keime mittels qPCR wurde die DNA der Proben zuerst mittels modifiziertem DNeasy Blood and Tissue Kit extrahiert. Die Ergebnisse zeigen, dass es beim Aufschlagen und anschließenden manuellen Trennen des Eihalts zu einer Kreuzkontamination von der Eierschale ($3,1 \pm 0,6 \log_{10}$ KbE/g) in den Eihalt, insbesondere ins Eiklar ($2,0 \pm 1,2 \log_{10}$ KbE/ml), kommen kann. Diese Keimzahl wurde mit einer qPCR ermittelt und mit dem kulturellen Nachweis bestätigt.

Darüber hinaus wurden im deutschen Einzelhandel erworbene Eierproben auf tote und lebende *Campylobacter* spp. untersucht. Dafür wurde eine PMA-qPCR entwickelt. Auf sieben von 30 (23,3 %) der aus dem Einzelhandel bezogenen Eier, die von je zehn Betrieben mit Öko-, Freiland- und Bodenhaltung stammten, wurde DNA von *C. jejuni* und/oder *C. coli* nachgewiesen. Im Fall eines Legebetriebs mit Bodenhaltung (2,3 % der Gesamtstichprobe) konnte mittels PMA-qPCR eine Belastung mit lebenden Keimen ($3,32 \log_{10}$ KbE/g) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Kontamination der Eierschale mit *Campylobacter* spp. beim manuellen Trennen des Eihalts ein mikrobiologisches Risiko der Übertragung *Campylobacter* spp. bestehen kann.

8 Summary

Campylobacteriosis, which is caused by *Campylobacter jejuni*, is currently the most common bacterial food-associated diarrheal disease in humans. Transmission of the germs through insufficiently cooked poultry meat, pork and beef, and non-pasteurized milk is widely documented. Eggs, too, can be regarded as a possible origin of infection with *Campylobacter* spp. if *Campylobacter* spp. from the outer eggshell are transferred to the egg contents through breaking and manual separation of the egg content.

In this study, challenge experiments were performed in which SPF eggs were artificially loaded with various concentrations of *C. jejuni*. After separation of the egg contents, eggshell, albumen, and yolk were examined by cultural and molecular biological methods. For detection of the germs by qPCR, the DNA of the samples was first extracted using the modified DNeasy Blood and Tissue Kit. The results show that cross-contamination from the eggshell into the egg contents ($3.1 \pm 0.6 \log_{10}$ cfu/g), especially into the albumen ($2.0 \pm 1.2 \log_{10}$ cfu/ml), may occur during breaking and subsequent manual separation of egg contents. This bacterial count was determined by qPCR and confirmed by cultural detection.

In addition, eggs purchased in German retail stores were tested for dead and live *Campylobacter* spp. For this purpose, a PMA-qPCR was developed. DNA of *C. jejuni* and/or *C. coli* was detected on seven out of thirty (23.3 %) of the samples purchased from the retail stores, which came from ten farms each with organic, free-range, and barn management, respectively. In the case of one laying farm with barn management (2.3 % of the total sample), a high load of live germs ($3.32 \log_{10}$ cfu/g) was detected by PMA-qPCR.

The results show that if the eggshell is contaminated with *Campylobacter* spp. there may be a microbiological risk of transmission of *Campylobacter* spp. into the egg contents during manual separation.

9 Literaturverzeichnis

- Acke, E. (2018). Campylobacteriosis in dogs and cats: a review. *New Zealand Veterinary Journal* 66(5): 221-228.
- Aebi, H. (1974). Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H. U. New York, NY/London, Academic Press: 673-684.
- Agunos, A., Waddell, L., Léger, D. und Taboada, E. (2014). A Systematic Review Characterizing On-Farm Sources of *Campylobacter* spp. for Broiler Chickens. *PLOS ONE* 9(8): 104905.
- Ajene, A. N., Fischer Walker, C. L. und Black, R. E. (2013). Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *Journal of health, population, and nutrition* 31(3): 299-307.
- Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M. und Hess, C. (2010). Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology* 59(3): 295-301.
- Allen, K. J. und Griffiths, M. W. (2001). Use of luminescent *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 to assess eggshell colonization and penetration in fresh and retail eggs. *Journal of Food Protection* 64(12): 2058-2062.
- Alter, T., Gaull, F., Kasimir, S., Gürtler, M., Mielke, H., Linnebur, M. und Fehlhaber, K. (2005). Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiology* 108(3): 251-261.
- Alter, T., Rösler, U. (2018). Vorkommen von *Campylobacter* auf und in Eiern: eine Literaturübersicht, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.
- Amel, B. K.-N., Amine, B. und Amina, B. (2008). Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiological Research* 163(3): 323-328.
- Anonymus (1996). *Microorganisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens*, Springer Science & Business Media.

- Anuchin, A. M., Mulyukin, A. L., Suzina, N. E., Duda, V. I., El-Registan, G. I. und Kaprelyants, A. S. (2009). Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology* 155(4): 1071-1079.
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S. und Makino, S. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology* 159(9): 709-717.
- Bacon, D. J., Szymanski, C. M., Burr, D. H., Silver, R. P., Alm, R. A. und Guerry, P. (2001). A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Molecular Microbiology* 40(3): 769-777.
- Bae, S. und Wuertz, S. (2009). Discrimination of viable and dead fecal *Bacteroidales* bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* 75(9): 2940-2944.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. und Donelli, G. (2003). Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *International Journal of Food Microbiology* 89(1): 31-39.
- Bagley, L. G. und Christensen, V. L. (1991). Hatchability and Physiology of Turkey Embryos Incubated at Sea Level with Increased Eggshell Permeability. *Poultry Science* 70(6): 1412-1418.
- Bahlinger, E., Dorn-In, S., Beindorf, P.-M., Mang, S., Kaltner, F., Gottschalk, C., Gareis, M. und Schwaiger, K. (2020). Development of two specific multiplex qPCRs to determine amounts of *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* in meat and heat-treated meat products. *International Journal of Food Microbiology* 337: 108932.
- Batz, M. B., Hoffmann, S. und Morris, J. G., Jr. (2012). Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *Journal of Food Protection* 75(7): 1278-1291.

- Baylis, C. L., MacPhee, S., Martin, K. W., Humphrey, T. J. und Betts, R. P. (2000). Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Applied Microbiology* 89(5): 884-891.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin/Heidelberg, Springer. 6. Aufl.
- Besnard, V., Federighi, M., Declercq, E., Jugiau, F. und Cappelier, J.-M. (2002). Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research* 33(4): 359-370.
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A. und Frost, J. A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters* 229(2): 237-241.
- Beumer, R. R., Cruysen, J. J. M. und Birtantie, I. R. K. (1988). The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. *Journal of Applied Bacteriology* 65(2): 93-96.
- BfR (2018). Hygiene fürs Hühnerei - Schutz vor *Campylobacter*: Stellungnahme Nr. 011/2018 des BfR vom 11. Mai 2018. Bundesinstitut für Risikobewertung 2018(011).
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. und Blaser, M. J. (1988). Experimental *Campylobacter jejuni* Infection in Humans. *The Journal of Infectious Diseases* 157(3): 472-479.
- Blackburn, C. d. W. und McClure, P. J. (2009). *Campylobacter and Arcobacter*. Foodborne Pathogens. Blackburn, C. D. W. und McClure, P. J. Sawston/Cambridge, Woodhead Publishing: 718-762.
- Blankenship, L. C. und Craven, S. E. (1982). *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 44(1): 88-92.
- Boes, J., Nersting, L., Nielsen, E. M., Kranker, S., Enøe, C., Wachmann, H. C. und Baggesen, D. L. (2005). Prevalence and Diversity of *Campylobacter jejuni* in Pig Herds on Farms with and without Cattle or Poultry. *Journal of Food Protection* 68(4): 722-727.
- Bogosian, G. und Bourneuf, E. V. (2001). A matter of bacterial life and death. *EMBO Reports* 2(9): 770-774.

- Böhm, R. (1993). Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 100: 275-278.
- Bolinger, H. und Kathariou, S. (2017). The Current State of Macrolide Resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. Applied and Environmental Microbiology 83(12).
- Bolton, F. J. und Robertson, L. (1982). A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. Journal of Clinical Pathology 35(4): 462-467.
- Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Piessens, V., Rasschaert, G., Debruyne, L., Heyndrickx, M., Herman, L. und Messens, W. (2008). Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. Journal of Applied Microbiology 105(6): 1909-1918.
- Bronowski, C., James, C. und Winstanley, C. (2014). Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. FEMS microbiology letters 356(1): 8-19.
- Bruce, J. und Drysdale, E. M. (1994). Trans-shell transmission. Microbiology of the avian egg. Board, R. G. und Fuller, R. Boston, MA, Springer: 63-91.
- Bui, X. T., Wolff, A., Madsen, M. und Bang, D. D. (2012). Reverse transcriptase real-time PCR for detection and quantification of viable *Campylobacter jejuni* directly from poultry faecal samples. Research in Microbiology 163(1): 64-72.
- Burak, S. und Gehrt, A. (2010). Verkürzte Analysezeit bei höherer Genauigkeit. Wiener klinisches Magazin 13(6): 22-26.
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. und Leach, S. A. (1998). Extended Survival and Persistence of *Campylobacter* spp. in Water and Aquatic Biofilms and Their Detection by Immunofluorescent-Antibody and -rRNA Staining. Applied and Environmental Microbiology 64(2): 733-741.
- Butzler, J. P. und Skirrow, M. B. (1979). *Campylobacter* enteritis. Clinics in gastroenterology 8(3): 737-765.
- Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S. M., Velge, P. und Federighi, M. (2007). Avirulent Viable But Non Culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. Veterinary Research 38(4): 573-583.

- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., Ferroni, A., Gutmann, L. und Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44(1): 104-109.
- Chaemsanit, S., Akbar, A. und Anal, A. K. (2015). Isolation of total aerobic and pathogenic bacteria from table eggs and its contents. *Food and Applied Bioscience Journal* 3(1): 1-9.
- Champion, O. L., Karlyshev, A. V., Senior, N. J., Woodward, M., La Ragione, R., Howard, S. L., Wren, B. W. und Titball, R. W. (2010). Insect Infection Model for *Campylobacter jejuni* Reveals That O-methyl Phosphoramidate Has Insecticidal Activity. *The Journal of Infectious Diseases* 201(5): 776-782.
- Chang, B., Taguri, T., Sugiyama, K., Amemura-Maekawa, J., Kura, F. und Watanabe, H. (2010). Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63(2): 119-123.
- Chirife, J., del Pilar Buera, M. und Labuza, T. P. (1996). Water activity, water glass dynamics, and the control of microbiological growth in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36(5): 465-513.
- Chuma, T., Makino, K., Okamoto, K. und Yugi, H. (1997). Analysis of Distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Broilers by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of Flagellin Gene. *Journal of Veterinary Medical Science* 59(11): 1011-1015.
- Clark, A. G. und Bueschkens, D. H. (1985). Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. *Applied and Environmental Microbiology* 49(6): 1467-1471.
- Colwell, R. R., Brayton, P., Herrington, D., Tall, B., Huq, A. und Levine, M. M. (1996). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12(1): 28-31.

- Cook, K. L. und Bolster, C. H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 103(3): 573-583.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. J. und Debevere, J. (2003). Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 94(5): 886-892.
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Buhr, R. J. und Fedorka-Cray, P. J. (2009). *Campylobacter* species occurrence within internal organs and tissues of commercial caged Leghorn laying hens. *Poultry Science* 88(11): 2449-2456.
- Cunningham, E., O'Byrne, C. und Oliver, J. D. (2009). Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* 20(12): 1141-1144.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Zoons, J., De Baere, K., Uyttendaele, M., Debevere, J. und Herman, L. (2005). Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *British Poultry Science* 46(2): 149-155.
- De Reu, K., Gijuspeerdt, K., Heyndrickx, M., Messens, W., Uyttendaele, M., Debevere, J. und Herman, L. (2006). Influence of Eggshell Condensation on Eggshell Penetration and Whole Egg Contamination with *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection* 69(7): 1539-1545.
- Deutscher Bundestag. (2013). Mitteilungspflichten von Legehennenhaltern. Zuletzt aufgerufen am 02.03.21, <https://www.bundestag.de/resource/blob/406012/7d19f159553673768d00c6b659a50f50/WD-5-024-13-pdf-data.pdf>.
- Donnison, A. (2003). Isolation of thermotolerant *Campylobacter* - Review & methods for New Zealand laboratories. Bericht für das Gesundheitsministerium von Neuseeland. Wellington.

- Dorn-In, S., Gareis, M. und Schwaiger, K. (2019). Differentiation of live and dead *Mycobacterium tuberculosis* complex in meat samples using PMA qPCR. *Food Microbiology* 84: 103275.
- EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Propan-2-ol as a carrier solvent for Flavourings. *EFSA Journal* 3(5): 202.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* 9(4): 2105.
- EFSA (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 16(12): 5500.
- EFSA (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12): 05926.
- Eyers, M., Chapelle, S., Van Camp, G., Goossens, H. und De Wachter, R. (1993). Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *Journal of Clinical Microbiology* 31(12): 3340-3343.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. und Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiology* 2013: 703813.
- Ferrero, R. L. und Lee, A. (1988). Motility of *Campylobacter jejuni* in a Viscous Environment: Comparison with Conventional Rod-shaped Bacteria. *Microbiology* 134(1): 53-59.
- Fittipaldi, M., Nocker, A. und Codony, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods* 91(2): 276-289.
- Gareis, M. (1995). Salmonellen: ein Überblick. *Fleischwirtschaft* 75(8): 954-957.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. und Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, NY, Springer.
- Ge, Z., Schauer, D. B. und Fox, J. G. (2008). In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cellular Microbiology* 10(8): 1599-1607.

- Gidamak.com. (2021). RZ 8 Egg Breaking And Separating Machine. Zuletzt aufgerufen am 02.03.21, <https://www.gidamak.com/RZ-8-Egg-Breaking-And-Separating-Machine>.
- Glünder, G. und Weber, R. (2000). *Campylobacter* beim Geflügel: Eine Übersicht über die Bedeutung und Bekämpfungsmöglichkeiten. Lohmann Information 2000(4).
- Gondek, M., Szkucik, K. und Bełkot, Z. (2013). Presence of pathogenic microorganisms on the surface of eggs from different hen-housing systems. *Medycyna Weterynaryjna* 69(6): 374-377.
- Goossens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van den Borre, C. und Butzler, J. P. (1986). Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* spp. from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium, and a filtration system. *Journal of Clinical Microbiology* 24(5): 840-843.
- Gourmelon, M., Cillard, J. und Pommepuy, M. (1994). Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology* 77(1): 105-112.
- Grashorn, M. A. (2021). *Geflügeljahrbuch 2021*. Stuttgart, Eugen Ulmer.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D. W., Stern, N. J. und Corn, J. L. (1997). Epidemiological Study of *Campylobacter* spp. in Broilers: Source, Time of Colonization, and Prevalence. *Avian Diseases* 41(4): 890-898.
- Greig, J. D. und Ravel, A. (2009). Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology* 130(2): 77-87.
- Gunasekera, T. S., Sørensen, A., Attfield, P. I. V., Sørensen, S. J. und Veal, D. A. (2002). Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1988-1993.
- Hahn, A. F. (1998). Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 352(9128): 635-641.
- Hannah, J. F., Wilson, J. L., Cox, N. A., Cason, J. A., Bourassa, D. V., Musgrove, M. T., Richardson, L. J., Rigsby, L. L. und Buhr, R. J. (2011). Comparison of shell bacteria from unwashed and washed table eggs harvested from caged laying hens and cage-free floor-housed laying hens. *Poultry Science* 90(7): 1586-1593.

- Harvey, R. B., Young, C. R., Ziprin, R. L., Hume, M. E., Genovese, K. J., Anderson, R. C., Droleskey, R. E., Stanker, L. H. und Nisbet, D. J. (1999). Prevalence of *Campylobacter* spp isolated from the intestinal tract of pigs raised in an integrated swine production system. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 215(11): 1601-1604.
- Hassane, D. C., Lee, R. B. und Pickett, C. L. (2003). *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin Promotes DNA Repair Responses in Normal Human Cells. *Infection and Immunity* 71(1): 541-545.
- Hazeleger, W. C., Wouters, J. A., Rombouts, F. M. und Abee, T. (1998). Physiological Activity of *Campylobacter jejuni*, Far below the Minimal Growth Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 3917-3922.
- He, X., Carter, J. M., Brandon, D. L., Cheng, L. W. und McKeon, T. A. (2007). Application of a real time polymerase chain reaction method to detect castor toxin contamination in fluid milk and eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(17): 6897-6902.
- He, Y. und Chen, C. Y. (2010). Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176. *Food Microbiology* 27(4): 439-446.
- Hébert, G. A., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Lambert, M. A., Blaser, M. J. und Moss, C. W. (1982). 30 years of campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 15(6): 1065-1073.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. und Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 11(9): 1026-1030.
- Hossain, A., Stewart-Tull, D. E. S. und Freer, J. H. (1993). Heat-labile and heat-stable haemolysins of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 6(4): 331-339.
- Humphrey, T., O'Brien, S. und Madsen, M. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology* 117(3): 237-257.
- Hutchison, M. L., Gittins, J., Walker, A., Moore, A., Burton, C. und Sparks, N. (2003). Washing table eggs: a review of the scientific and engineering issues. *World's Poultry Science Journal* 59(2): 233-248.

- Hutchison, M. L., Gittoms, J., Walker, A., Sparks, N., Humphrey, T. J., Burton, C. und Moore, A. (2004). An Assessment of the Microbiological Risks Involved with Egg Washing under Commercial Conditions. *Journal of Food Protection* 67(1): 4-11.
- Igwaran, A. und Okoh, A. I. (2019). Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. *Heliyon* 5(11): 2814.
- Islam, M. (2018). Antibiotic sensitivity and resistant pattern of bacteria isolated from table eggs of commercial layers considering food safety issue. *Asian Journal of Medical and Biological Research* 4(4).
- ISO (2018). ISO 10272-1: Untersuchung von Lebensmitteln, Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. Genf, International Organization for Standardization.
- Iwata, S. (1998). Structure and function of bacterial cytochrome c oxidase. *The Journal of Biochemistry* 123(3): 369-375.
- Izat, A. L. und Gardner, F. A. (1988). Incidence of *Campylobacter jejuni* in processed egg products. *Poultry Science* 67(10): 1431-1435.
- Jacobs-Reitsma, W., Lyhs, U. und Wagenaar, J. (2008). *Campylobacter* in the Food Supply. *Campylobacter*. Nachamkin, I. und Blaser, M. J. Washington, DC, American Society of Microbiology.
- Johansson, L. H. und Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry* 174(1): 331-336.
- Jones, D. R., Guard, J., Gast, R. K., Buhr, R. J., Fedorka-Cray, P. J., Abdo, Z., Plumlee, J. R., Bourassa, D. V., Cox, N. A., Rigsby, L. L., Robison, C. I., Regmi, P. und Karcher, D. M. (2016). Influence of commercial laying hen housing systems on the incidence and identification of *Salmonella* and *Campylobacter*. *Poultry Science* 95(5): 1116-1124.
- Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E. und Hoorfar, J. (2010). Rapid Quantification of Viable *Campylobacter* Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 76(15): 5097-5104.

- Jurinke, C., Oeth, P. und van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular Biotechnology* 26(2): 147-163.
- Kaprelyants, A. S. und Kell, D. B. (1993). The use of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualisation of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. *Journal of Microbiological Methods* 17(2): 115-122.
- Keer, J. T. und Birch, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* 53(2): 175-183.
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R. und Barer, M. R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(2): 169-187.
- Ketley, J. M. (1997). Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 143(1): 5-21.
- Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Procop, G. W., Hall, G. S. und Bauer, T. W. (2009). Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64(4): 445-447.
- Köhler, W. (1975). Klinische Mikrobiologie. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 15(8): 653-653.
- Köhler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. und Pulverer, G. (2001). *Medizinische Mikrobiologie*. München/Jena, Urban & Fisher.
- Kovalcuks, A. und Duma, M. (2014). Solvent extraction of egg oil from liquid egg yolk. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food for Consumer Well-Being", Jelgava. 253-256.
- Lara-Tejero, M. und Galán, J. E. (2002). Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in Microbiology* 10(3): 147-152.
- Lawes, J. R., Vidal, A., Clifton-Hadley, F. A., Sayers, R., Rodgers, J., Snow, L., Evans, S. J. und Powell, L. F. (2012). Investigation of prevalence and risk factors for *Campylobacter* in broiler flocks at slaughter: results from a UK survey. *Epidemiology and Infection* 140(10): 1725-1737.

- Lay Jr, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* 20(4): 172-194.
- Leleu, S., Messens, W., De Reu, K., De Preter, S., Herman, L., Heyndrickx, M., De Baerdemaeker, J., Michiels, C. W. und Bain, M. (2011). Effect of Egg Washing on the Cuticle Quality of Brown and White Table Eggs. *Journal of Food Protection* 74(10): 1649-1654.
- Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. und Stanley, J. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology* 35(10): 2568-2572.
- Logan, J. M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A. J. und Stanley, J. (2000). *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2): 865-872.
- Lv, R., Wang, K., Feng, J., Heeney, D. D., Liu, D. und Lu, X. (2019). Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology* 10: 2920.
- Maalej, S., Denis, M. und Dukan, S. (2004). Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology* 150(1): 181-187.
- Madden, R. H., Moran, L. und Scates, P. (2000). Optimising recovery of *Campylobacter* spp. from the lower porcine gastrointestinal tract. *Journal of Microbiological Methods* 42(2): 115-119.
- Mansfield, L. S. und Abner, S. R. (2000). Molecular mechanisms governing *Campylobacter* pathogenicity. *Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis*. Cary, J. W., Linz, J. E. und Bhatnagar, D. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Marsden, G. L., Li, J., Everest, P. H., Lawson, A. J. und Ketley, J. M. (2009). Creation of a Large Deletion Mutant of *Campylobacter jejuni* Reveals that the Lipooligosaccharide Gene Cluster Is Not Required for Viability. *Journal of Bacteriology* 191(7): 2392-2399.
- Mascher, F., Hase, C., Moënne-Loccoz, Y. und Défago, G. (2000). The Viable-but-Nonculturable State Induced by Abiotic Stress in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0

- Does Not Promote Strain Persistence in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4): 1662-1667.
- Maue, A. C., Mohawk, K. L., Giles, D. K., Poly, F., Ewing, C. P., Jiao, Y., Lee, G., Ma, Z., Monteiro, M. A., Hill, C. L., Ferderber, J. S., Porter, C. K., Trent, M. S. und Guerry, P. (2013). The polysaccharide capsule of *Campylobacter jejuni* modulates the host immune response. *Infection and Immunity* 81(3): 665-672.
- Mayr, A. M., Lick, S., Bauer, J., Thärigen, D., Busch, U. und Huber, I. (2010). Rapid Detection and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in Food, Using Multiplex Real-Time PCR. *Journal of Food Protection* 73(2): 241-250.
- Melero, B., Cocolin, L., Rantsiou, K., Jaime, I. und Rovira, J. (2011). Comparison between conventional and qPCR methods for enumerating *Campylobacter jejuni* in a poultry processing plant. *Food Microbiology* 28(7): 1353-1358.
- Méndez-Olvera, E. T., Bustos-Martínez, J. A., López-Vidal, Y., Verdugo-Rodríguez, A. und Martínez-Gómez, D. (2016). Cytolethal Distending Toxin From *Campylobacter jejuni* Requires the Cytoskeleton for Toxic Activity. *Jundishapur journal of microbiology* 9(10): 35591.
- Messelhauser, U., Tharigen, D., Elmer-Englhard, D., Bauer, H., Schreiner, H. und Holler, C. (2011). Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. on eggshells: a missing link for food-borne infections? *Applied and Environmental Microbiology* 77(11): 3896-3897.
- Meyer, R. (2015). Entwicklung einer Methode zur Diskriminierung lebender *Salmonella*-Enteritidis- und *Salmonella*-Typhimurium-Impfstämme sowie Etablierung und Evaluierung einer molekularbiologischen Methode zur raschen Identifizierung von *Salmonella*-Serovaren. Dissertation, LMU München.
- Millet, V. und Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30(2): 136-141.
- Miroshnichenko, M. L., L'Haridon, S., Schumann, P., Spring, S., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Jeanthon, C. und Stackebrandt, E. (2004). *Caminibacter profundus* sp. nov., a novel thermophile of *Nautiliales* ord. nov. within the class 'Epsilonproteobacteria', isolated

- from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(1): 41-45.
- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J. A. und Barcina, I. (2008). Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology* 64(1): 28-36.
- Murphy, C., Carroll, C. und Jordan, K. N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology* 100(4): 623-632.
- Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A. und Harrison, M. A. (2004). Identification of *Enterobacteriaceae* from Washed and Unwashed Commercial Shell Eggs. *Journal of Food Protection* 67(11): 2613-2616.
- Nadeau, É., Messier, S. und Quessy, S. (2002). Prevalence and Comparison of Genetic Profiles of *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry and Sporadic Cases of Campylobacteriosis in Humans. *Journal of Food Protection* 65(1): 73-78.
- Näther, G., Alter, T., Martin, A. und Ellerbroek, L. (2009). Analysis of risk factors for *Campylobacter* species infection in broiler flocks. *Poultry Science* 88(6): 1299-1305.
- Nauta, M., Hill, A., Rosenquist, H., Brynestad, S., Fetsch, A., van der Logt, P., Fazil, A., Christensen, B., Katsma, E., Borck, B. und Havelaar, A. (2009). A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. *International Journal of Food Microbiology* 129(2): 107-123.
- Ngulukun, S. S. (2017). Taxonomy and physiological characteristics of *Campylobacter* spp. *Campylobacter*. 2017: 41-60.
- Nicolò, M. S., Gioffrè, A., Carnazza, S., Platania, G., Di Silvestro, I. und Guglielmino, S. P. P. (2011). Viable But Nonculturable State of Foodborne Pathogens in Grapefruit Juice: A Study of Laboratory. *Foodborne Pathogens and Disease* 8(1): 11-17.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y. und Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67(2): 310-320.

- Nyati, K. K. und Nyati, R. (2013). Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. *BioMed Research International* 2013: 852195.
- Nyström, T. (2001). Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology* 176(3): 159-164.
- Oliver, J. D. (2000). The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Colwell, R. R. und Grimes, D. J. Boston, MA, Springer: 277-300.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43(Sonderheft): 93-100.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4): 415-425.
- Ordax, M., Biosca, E. G., Wimalajeewa, S. C., López, M. M. und Marco-Noales, E. (2009). Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology* 107(1): 106-116.
- Oyofe, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavlovskis, O. R. und Guerry, P. (1992). Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30(10): 2613-2619.
- Pacholewicz, E., Swart, A., Lipman, L. J. A., Wagenaar, J. A., Havelaar, A. H. und Duim, B. (2013). Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR. *Journal of Microbiological Methods* 95(1): 32-38.
- Pan, Y. und Breidt, F. (2007). Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 73(24): 8028-8031.
- Parisi, M. A., Northcutt, J. K. und Smith, D. P. (2015). Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control* 47: 161-165.
- Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 74(3): 177-188.

- Paula, A. T., Fonesca, B. B., Silva, M. S. und Rossi, D. A. (2009). Viability of *Campylobacter jejuni* in commercial eggs. *Bioscience Journal* 25(6): 143-148.
- Pearson, A. D., Greenwood, M., Healing, T. D., Rollins, D., Shahamat, M., Donaldson, J. und Colwell, R. R. (1993). Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(4): 987-996.
- Perelle, S., Josefsen, M., Hoorfar, J., Dilasser, F., Grout, J. und Fach, P. (2004). A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Molecular and Cellular Probes* 18(5): 321-327.
- Petrak, T., Medic, H., Novakovic, P. und Botka-Petrak, K. (2000). Bacteriological contamination of egg products after thermal preservation processes. *Acta Alimentaria* 29(4): 315-322.
- Porter, I. A. und Reid, T. M. S. (1980). A milk-borne outbreak of *Campylobacter* infection. *Journal of Hygiene* 84(3): 415-419.
- Prinzinger, R., Preßmar, A. und Schleucher, E. (1991). Body temperature in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 99(4): 499-506.
- Rasschaert, G., Houf, K., Van Hende, J. und De Zutter, L. (2007). Investigation of the concurrent colonization with *Campylobacter* and *Salmonella* in poultry flocks and assessment of the sampling site for status determination at slaughter. *Veterinary Microbiology* 123(1-3): 104-109.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. und Deutzmann, R. (2016). *Duale Reihe: Biochemie*. Stuttgart, Thieme. 4. Aufl.
- RKI (2006). Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* 2006(1).
- RKI. (2021). *Campylobacter*-Enteritis. Zuletzt aufgerufen am 02.03.21, https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html.
- Robinson, D. A. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal, Clinical Research Edition* 282(6276): 1584.

- Rodgers, J. D., Lawes, J. R., Vidal, A. B., Ellis-Iversen, J., Ridley, A., Pleydell, E. J., Powell, L. F., Toszeghy, M., Stapleton, K. und Clifton-Hadley, F. A. (2012). Characteristics and comparative performance of direct culture, direct PCR and enumeration methods for detection and quantification of *Campylobacter* spp. in broiler caeca. *Veterinary Microbiology* 159(3): 390-396.
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. und Ridgway, H. F. (1992). Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58(6): 1801-1808.
- Rollins, D. M. und Colwell, R. R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 52(3): 531-538.
- Ropper, A. H. (1992). The Guillain-Barré syndrome. *The New England Journal of Medicine* 326(17): 1130-1136.
- Rosner, B. (2017). Epidemiologie und Risikofaktoren von *Campylobacter*-Infektionen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 2017(44).
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M. und Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 1018-1024.
- Sachidanandham, R. und Yew-Hoong Gin, K. (2009). A dormancy state in nonspore-forming bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(5): 927-941.
- Sahin, O., Kobalka, P. und Zhang, Q. (2003). Detection and survival of *Campylobacter* in chicken eggs. *Journal of Applied Microbiology* 95(5): 1070-1079.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampers, I., Habib, I., De Zutter, L., Dumoulin, A. und Uyttendaele, M. (2010). Survival of *Campylobacter* spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration,

- minor salt concentration, and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 137(2): 147-153.
- Sato, M. und Sashihara, N. (2010). Occurrence of *Campylobacter* in commercially broken liquid egg in Japan. *Journal of Food Protection* 73(3): 412-417.
- Schwieger, F. und Tebbe, C. C. (1998). A New Approach To Utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4870-4876.
- Sebald, M. und Veron, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annales de l'Institut Pasteur* 105(5): 897-910.
- Seeley, H. W., Jr. und Vandemark, P. J. (1962). *Microbes in action. A laboratory manual of microbiology.* San Francisco/London, W. H. Freeman & Co.
- Seinige, D., Krschek, C., Klein, G. und Kehrenberg, C. (2014). Comparative analysis and limitations of ethidium monoazide and propidium monoazide treatments for the differentiation of viable and nonviable *Campylobacter* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 80(7): 2186-2192.
- Shane, S. M., Gifford, D. H. und Yogasundram, K. (1986). *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Veterinary Research Communications* 10(6): 487-492.
- Shane, S. M. (1992). The significance of *Campylobacter jejuni* infection in poultry: A review. *Avian Pathology* 21(2): 189-213.
- Shane, S. M. (2000). *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 19(2): 376-395.
- Shanker, S., Lee, A. und Sorrell, T. C. (1986). *Campylobacter jejuni* in broilers: the role of vertical transmission. *Epidemiology & Infection* 96(2): 153-159.
- Shi, Y., Wu, S., Li, W., Liu, D., Ma, G., Zhang, Z., Yuan, L., Li, H., Zhang, S., Mushtaq, N. und Xu, J. (2020). Microbiota Analysis of Eggshells in Different Areas and During Different Storage Time by Non-cultural Methods. *Current Microbiology* 77(12): 3842-3850.

- Signoretto, C., del Mar Lleò, M., Tafi, M. C. und Canepari, P. (2000). Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1953-1959.
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L. und Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection* 22(2): 103-109.
- Skirrow, M. B. (1981). *Campylobacter* enteritis in dogs and cats: A 'new' zoonosis. *Veterinary Research Communications* 5(1): 13-19.
- Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Takade, A. und Yoshida, S. (2007). Photoactivated Ethidium Monoazide Directly Cleaves Bacterial DNA and Is Applied to PCR for Discrimination of Live and Dead Bacteria. *Microbiology and Immunology* 51(8): 763-775.
- Stahl, M., Butcher, J. und Stintzi, A. (2012). Nutrient Acquisition and Metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 5.
- Stanley, K. N., Wallace, S. J., Currie, J. E., Diggle, P. J. und Jones, K. (1998). The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle and calves. *Journal of Applied Microbiology* 85(3): 472-480.
- Sulonen, J., Karenlampi, R., Holma, U. und Hanninen, M. L. (2007). *Campylobacter* in Finnish organic laying hens in autumn 2003 and spring 2004. *Poultry Science* 86(6): 1223-1228.
- Tenover, F. C., Knapp, J. S., Patton, C. und J., P. J. (1985). Use of auxotyping for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. *Infection and Immunity* 48(2): 384-388.
- Terzieva, S. I. und McFeters, G. A. (1991). Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Canadian Journal of Microbiology* 37(10): 785-790.
- Thornton, S. A., Logan, S. M., Trust, T. J. und Guerry, P. (1990). Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infection and Immunity* 58(8): 2686-2689.

- Toplak, N., Kovač, M., Piskernik, S., Možina, S. S. und Jeršek, B. (2012). Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 112(4): 752-764.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. und Palmer, J. D. (1999). Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(4): 327-338.
- Uyttendaele, M., Baert, K., Ghafir, Y., Daube, G., De Zutter, L., Herman, L., Dierick, K., Pierard, D., Dubois, J. J., Horion, B. und Debevere, J. (2006). Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 111(2): 149-163.
- van den Berg, B., Bunschoten, C., van Doorn, P. A. und Jacobs, B. C. (2013). Mortality in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 80(18): 1650-1654.
- van Doorn, P. A., Ruts, L. und Jacobs, B. C. (2008). Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *The Lancet Neurology* 7(10): 939-950.
- Wagner, A. O., Praeg, N., Reitschuler, C. und Illmer, P. (2015). Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. *Applied Soil Ecology* 93: 56-64.
- Wallace, J. S., Stanley, K. N., Currie, J. E., Diggle, P. J. und Jones, K. (1997). Seasonality of thermophilic *Campylobacter* populations in chickens. *Journal of Applied Microbiology* 82(2): 219-224.
- Wang, H. und Slavik, M. (1998). Bacterial Penetration into Eggs Washed with Various Chemicals and Stored at Different Temperatures and Times. *Journal of Food Protection* 61(3): 276-279.
- Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M. und Siddique, I. (2000). Fecal Shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* 66(5): 1994-2000.

- Williams, L. K., Fonseca, B. B. und Humphrey, T. J. (2016). *Campylobacter jejuni* in Poultry: A Commensal or a Pathogen? *Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry: Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology. Fonseca, B. B., Fernandez, H. und Rossi, D. A. Cham, Springer International Publishing: 75-87.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. und Rasmussen, R. P. (1997). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques* 22(1): 130-138.
- Yamamoto, H. (2000). Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy* 6(2): 112-114.
- Yáñez, M. A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L. und Catalán, V. (2011). Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* 85(2): 124-130.
- Young, K. T., Davis, L. M. und Dirita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 5(9): 665-679.
- Zentralverband der Deutschen Geflügelwirtschaft. (2021). Deutsche Eier – Haltungsformen. Zuletzt aufgerufen am 02.03.21, <http://www.deutsche-eier.info/die-henne/haltungsformen/>.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fließschema zur Taxonomie von <i>Campylobacter</i> (modifiziert nach Garrity et al. (2004)).....	17
Abbildung 2: <i>Campylobacter</i> spp. (RKI, 2018)	18
Abbildung 3: Nachweis von thermophilen <i>Campylobacter</i> spp. nach ISO 10272:2017	29
Abbildung 4: Beispiel für den Output einer real-time PCR bzw. qPCR	32
Abbildung 5: Schematische Darstellung des MALDI-TOF MS (verändert nach Burak und Gehrt (2010))	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung der PMA-Behandlung.....	35
Abbildung 7: Schematische Darstellung zum Ablauf der Challengetestes	45
Abbildung 8: Kontamination der Eierschale, Trennung des Eiinhalts und Anzucht auf mCCDA-Platte	47
Abbildung 9: DNA-Extraktion mittels Isolate Genomic II DNA Extraktionskit (Bioline).....	48
Abbildung 10: DNA-Extraktion mittels CTAB	50
Abbildung 11: DNA-Extraktion mittels DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)	51
Abbildung 12: DNA-Extraktionsmethode für die Reinkultur auf Festmedien	53
Abbildung 13: Fließschema der Behandlung von <i>C. jejuni</i> mit Propidium-Monoazid (PMA)..	57
Abbildung 14: PCR-Amplifikation von 39 Isolaten der Eierschale mittels Primerpaar 8-F & 926-R.....	62
Abbildung 15: Schmelzkurven-Analyse von 39 Isolaten der Eierschale mittels Primerpaar 8-F & 926-R	62
Abbildung 16: PCR-Amplifikation von <i>C. jejuni</i> mittels Primerpaar PG50 & PG3	63
Abbildung 17: Schmelzkurven-Analyse von <i>C. jejuni</i> mittels Primerpaar PG50 & PG3	63
Abbildung 18: Übertragung der <i>C. jejuni</i> von der Eierschale (KbE/g) auf das Eiklar (KbE/ml) bei fünf Testpersonen.....	67
Abbildung 19: Vergleich zwischen zwei PMA-Konzentrationen bei frischen und toten <i>C. jejuni</i> -Kulturen mittels PMA-qPCR.....	68
Abbildung 20: Positiv auf <i>Campylobacter</i> spp. getestete Eierproben aus dem Einzelhandel, ermittelt mittels PMA-qPCR	70

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tenazität thermophiler <i>Campylobacter</i> spp. (modifiziert nach Anonymus (1996)).....	18
Tabelle 2:	Überblick über die 27 Spezies und acht Subspezies von <i>Campylobacter</i> spp. und ihre Wirte (modifiziert nach Ngulukun (2017)).....	19
Tabelle 3:	Übersicht ausgewählter Tierarten und die Anzahl an positiven Proben für <i>Campylobacter</i> spp. (EFSA, 2018).....	20
Tabelle 4:	Prävalenzen von <i>Campylobacter</i> spp. bei Legehennen und Eiern (modifiziert nach Alter (2018)).....	22
Tabelle 5:	Übersicht über einige biochemische Reaktionen von thermophilen <i>Campylobacter</i> spp. (modifiziert nach Logan et al. (2000)).....	30
Tabelle 6:	Übersicht über die im Handel erworbenen Eierproben.....	37
Tabelle 7:	Verwendete Nährmedien mit Angaben zur Herstellung.....	38
Tabelle 8:	Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen.....	39
Tabelle 9:	Verwendete Geräte für die mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen.....	41
Tabelle 10:	Mikrobiota auf der Eioberfläche der SPF-Eier.....	59
Tabelle 11:	DNA-Extraktionsmethode für <i>C. jejuni</i> im Eiklar und Eidotter, Nachweisgrenze und aufgetretene Probleme.....	61
Tabelle 12:	C _t -Werte (Anzahl der PCR-Zyklen) der Proben, die mit <i>C. jejuni</i> künstlich kontaminiert wurden.....	65
Tabelle 13:	Molekularbiologischer und kultureller Nachweis der Übertragung von <i>C. jejuni</i> von der Eierschale auf den Eiinhalt.....	66

12 Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir diese Doktorarbeit mit diesem spannenden Thema ermöglicht hat, mich intensiv betreut und auch über die Dissertation hinaus unterstützt und gefördert hat. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. Samart Dorn-In für seine sehr gute Betreuung, die vielen hilfreichen Ratschläge und Ideen, sein fachliches Wissen und seine Motivation bedanken.

Auch bei Frau Prof. Dr. Karin Schwaiger und Frau Dr. Irene Esteban Cuesta möchte ich mich für die vielen Vorschläge und Diskussionen, die guten Nachfragen und Anregungen bedanken.

Ein großer Dank gilt den technischen Assistentinnen des Lehrstuhls, die mich in die Arbeitsmethoden in den Laboren eingearbeitet haben und mich während der gesamten Zeit der experimentellen Arbeit in großem Maß unterstützt haben. Hier möchte ich vor allem Frau Johanna Dietz und Frau Verena Hohenester nennen.

Zudem möchte ich meinen Kollegen und Kolleginnen für die großartige Zeit am Lehrstuhl danken.

Außerdem möchte ich auch ganz herzlich Manuel Kugler von der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische für seine Hilfe, Unterstützung, Vorschläge und das stetige Zurverfügungstellen von neuen SPF-Eiern danken.

Außerdem möchte ich meinen Freunden danken, die mich motiviert, unterstützt und mir in diesem Lebensabschnitt zur Seite gestanden haben.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich an Katharina Niedhammer richten, die mir mit Rat und großer Hilfe zur Seite stand.

Mein größter Dank gilt zum Schluss meinen Eltern Marie-Luise und Jürgen Daldrup, meinem Freund Max, meinen Geschwistern Miriam Kehr und Fabian Daldrup, meinem Schwager Christian Kehr, María Jiménez, meiner Tante Marlis Daldrup und Dirk Fidora, die immer an mich geglaubt, mich motiviert und mich unterstützt haben.