

Universitätsklinik für Geflügel
Veterinärmedizinische Universität Wien
Vorstand: Univ.Prof. Dr. Lore Vasicek
A-1210 Wien, Veterinärplatz 1
Tel.: 250 77 / DW 5151 FAX: DW 5192

Wien, den 21. Juni 2001

An das
Bundesministerium für Landwirtschaft
Stubenring 1
1010 Wien

**Forschungsauftrag: „Studie zur Ermittlung von
Eintragsquellen von Campylobacter in Geflügelbestände
unter besonderer Berücksichtigung von Betriebsform und –
struktur sowie Jahreszeit des Eintrags.“**

Forschungsprojekt Nr. : 1115 GZ 24.002/11-IIA1a/98

Univ.Prof. Dr. L. Vasicek

Unter Mitarbeit von:

Dr. W. Szölgyenyi †

Mag. C. Neubauer

Mag. V. Jauk

Mag. C. Gabler

Mag. D. Bibl

Mag. M. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
2. Literaturübersicht	
2.1. Taxonomie und Charakterisierung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter.....	
2.2. Differenzierung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter.....	
2.2.1 Biochemie.....	
2.2.2. Serologie.....	
2.2.3. Molekulargenetik.....	
2.3. Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter beim Menschen.....	
2.5 Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter beim Nutzgeflügel.....	
2.6 Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter bei verschiedenen Haustieren	
3. Material und Methode	
3.1. Art der Proben.....	
3.1.1. Betriebe.....	
3.1.2. Fragebogen.....	
3.1.3. Probensammlung.....	
3.1.4. Transport.....	
3.1.5. Auswahl der Betriebe für den ersten Untersuchungsgang.....	
3.1.6. Auswahl der Betriebe für den zweiten, dritten und vierten Untersuchungsgang.....	
3.1.7. Erweiterter Probenziehungsplan für den zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchgang.....	
3.1.8. Probenziehung.....	
3.2. Aufarbeitung der Proben.....	
3.2.1. Kulturverfahren.....	
3.2.2. Probenverarbeitung.....	
3.2.3. Identifikation von Campylobacter.....	
3.3. Differenzierung der Isolate.....	
3.3.1. Vidas-System.....	

3.3.2.	Biochemische Stammdifferenzierung.....	
3.3.3.	Molekulargenetische Stammdifferenzierung.....	
3.3.4.	Gaschromatographie.....	
3.4.	Statistische Auswertung.....	
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	
4.1.	Ergebnisse des ersten Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt.....	
4.2.	Ergebnisse des zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt.....	
4.3.	Ergebnisse der biochemischen Differenzierung der Campylobacter-positiven Isolate des zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchganges.....	
4.4.	Ergebnisse der molekulargenetischen Differenzierung der Campylobacter- positiven Isolate des zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchganges.....	
4.5.	Ergebnisse der Vidas-Analyse.....	
4.6.	In der Folge sollen verschiedene relevante Ergebnisse einer statistischen Analyse unterzogen werden.....	
4.6.1.	Zusammenhang zwischen der Betriebsgrösse (Anzahl der Mastplätze) und dem Vorhandensein von C.-positiven Betrieben (%).....	
4.6.2.	Einfluss von der Anzahl der Herden im Betrieb auf das Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.3.	Stalleinheiten mit gemeinsamem Vorraum (in einem Gebäude) - der gleiche Campylobacter?.....	
4.6.4.	Alter der Herde- Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.5.	Alter des Stallgebäudes - Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.6.	Einstreumaterial (Stroh / Hobelspäne) - Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.7.	Futter als Eintragsquelle von Campylobacter in den Bestand.....	
4.6.8.	Unterschiedlichen Wasserversorgung (öffentlich oder Hausbrunnen) - Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.9.	Tränksystem- Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.10.	Vorkommen von Nagern (Mäuse) und Insekten (Käfer, Fliegen) - Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.11.	Hygienemassnahmen (Mantel, Desinfektionswanne, Schuhe)- Auftreten von Campylobacter.....	

4.6.12. Anwesenheit von anderen Tieren am Betrieb	
- Auftreten von Campylobacter.....	
4.6.13. Kontinuität der Campylobacter-Befunde (pos./neg.) auf Betriebsebene.....	
4.6.14. Hat die Jahreszeit einen Einfluss auf das Auftreten von Campylobacter ?..	
5. Schlussfolgerung, Massnahmen.....	
6. Zusammenfassung.....	
7. Literaturverzeichnis.....	

1. Einleitung

Infektionen mit *Campylobacter* (*C.*) spp. zählen zu den häufigsten Ursachen gastroenteritischer Erkrankungen des Menschen. In den USA erkrankten alljährlich 2,5 Millionen Menschen an durch *Campylobacter* verursachten akuten Durchfallserkrankungen mit über 200 Todesfällen (MANDAL et al., 1984; STERN u. ROHBACH, 1995). Zu den wichtigsten humanpathogenen Arten zählen *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*, welche im Darmtrakt zahlreicher Tierspezies, teils als Verursacher subklinischer Erkrankungen, teils als Bestandteil der physiologischen Darmflora gefunden werden (GREGORY et al., 1997).

In unterschiedlichem, zum Teil hohem Prozentsatz konnte aus Kotproben des Wirtschaftsgeflügels *Campylobacter* isoliert werden. Daraus ergibt sich eine potentielle Gefahrenquelle für die in Mast- und Legebetriebe und in der verarbeitenden Industrie beschäftigten Menschen sowie für den Konsumenten kontaminierter Geflügelprodukte. Die Entwicklung von Strategien zur Minderung des Infektionsrisikos für den Menschen sind ein vorrangiges Ziel in der Bekämpfung der Zoonoseerreger.

Manche Fragestellungen hinsichtlich der Epidemiologie der *Campylobacter* sind trotz zahlreicher internationaler Studien noch nicht geklärt. Jedoch läßt sich aus diesen Studien die besondere Bedeutung horizontaler Infektionswege erkennen.

Ziel der an der Universitätsklinik für Geflügel der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführten Untersuchungen waren die Erhebung der Häufigkeit des Auftretens von *C.* spp. in Geflügelmastbetrieben und die Überprüfung der möglichen Eintragsquellen unter Beachtung jahreszeitlicher Einflüsse. Auf Untersuchungen in Brütereien wurde wegen der geringen Bedeutung vertikaler Infektionswege verzichtet.

Da Literaturangaben zur Methodik der Isolierung und Differenzierung von *Campylobacter* nicht einheitlich sind, mussten in der Anfangsphase des Projektes Fragestellungen wie der Einflüsse des Transportes von Sammelkotproben auf Isolierungsraten, Effizienz unterschiedlicher Anreicherungsverfahren, bakteriologische Kultivierung und biochemische Differenzierung der isolierten Erreger behandelt werden.

Zur Abklärung der biochemischen Differenzierungsverfahren und ihrer Aussagekraft wurde weiters ein Diagnoseverfahren auf Basis der Polymerase Chain Reaction (PCR) eingerichtet. Darauf aufbauend konnten wir mittels Restriktionsenzymen und einer weiteren PCR-Technik die *C.* spp. differenzieren.

Mit der Studie sollen Grundlagen für präventive Maßnahmen in Hinblick auf Infektionen von Mastherden mit *C.* spp. geschaffen werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Taxonomie und Charakterisierung der Genera *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter*

Nach MURRAY et al. (1999) umfasst das Genus *Campylobacter* 18 Spezies und Subspezies, wobei die Gruppe der thermophilen *Campylobacter* (*C.*), *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* bevorzugt beim Geflügel vorkommt und lebensmittelhygienisch von Bedeutung ist. Die wichtigsten Vertreter der Gruppe der nicht-thermophilen *Campylobacter* sind *C. fetus* und *C. hyointestinalis*, welche hauptsächlich bei Rind und Schwein zu finden.

Die Bakterien des Genus *Campylobacter* wurden von KARMALI u. SKIRROW (1984) als schmale, gramnegative Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,2 – 0,5 µm bei einer Länge von 0,5 – 5 µm beschrieben. Sie können gebogen, s-förmig, möwenflügelähnlich bei der Anlagerung von 2 Zellen oder spiralig gewunden sein. In älteren Kulturen können auch sphärische oder kokkoide Formen auftreten. Sie besitzen eine polare Geißel an einem oder beiden Zellenden, die ihnen eine charakteristische pfeilartig schnelle, korkenzieherähnliche Beweglichkeit verleihen. Sporen werden nicht gebildet.

Campylobacter stellen hohe Ansprüche an die Wachstumsbedingungen und Nährmedien (SMIBERT, 1984). Sie benötigen ein mikroaerobes Milieu, das 5 % Sauerstoff, 10 % Kohlendioxid und 85 % Stickstoff enthält. Das Temperaturoptimum der thermophilen *Campylobacter* liegt bei 42-43°C, während die nicht-thermophilen *Campylobacter* Temperaturen zwischen 25-37°C bevorzugen.

Eine Bebrütungsdauer von 48 Stunden ist notwendig.

In wässrigen Milieu werden die spiralig geformten *Campylobacter* allmählich in kokkoide Zellen transformiert, die zwar noch lebensfähig sind, jedoch nicht mit den herkömmlichen mikrobiologischen Techniken zum Wachstum veranlasst werden können (STERN, 1992). Die Fähigkeit dieser nicht-kultivierbaren Formen - im englischen Sprachgebrauch als „viable-but-non-culturable-forms“ bezeichnet (JONES et al., 1991) - , den Verdauungstrakt von Hühnern zu kolonisieren ist umstritten.

Basierend auf der Arbeit von VANDAMME et al. (1991) wurde die Gruppe der aerotoleranten *Campylobacter* zu dem eigenständigen Genus *Arcobacter* (A.) zusammengefasst.

Dieser umfasst derzeit 4 Spezies:

A. butzleri, *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. skirrowii*

THOMPSON et al. (1988) konnte molekulargenetisch eine sehr enge Verwandtschaft zum Genus *Campylobacter* nachweisen.

Aerotoleranz und die Fähigkeit bei niedrigeren Temperaturen (15-25°C) zu wachsen, unterscheidet *A.* von dem phänotypisch sehr ähnlichen Genus *Campylobacter*.

VANDAMME u. DE LEY (1991) fassten aufgrund der phylogenetischen und phänotypischen Merkmale die Genera *Arcobacter* und *Campylobacter* zur Familie der *Campylobacteraceae* zusammen.

Das Genus *Helicobacter* (H.), Fam. *Spirillaceae*, umfasst 11 Spezies. 1994 beschrieb STANLEY et. al. die Spezies *H. pullorum*, welche aus Geflügelproben isoliert werden konnte. Eine phänotypische Unterscheidung der Spezies *H. pullorum* von der Gruppe der thermophilen *Campylobacter* ist nur anhand der Indoxylacetathydrolyse und der Sensibilität gegenüber Nalidixinsäure möglich (MURRAY et al., 1999).

2.2. Differenzierung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter

2.2.1 Biochemie

Die traditionelle Identifizierung von Spezies der Gattungen Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter erfolgte anhand ihrer phänotypischen Eigenschaften (Tab.1). Diese werden mit Hilfe biochemischer Tests, Sensibilitätsprüfungen und den optimalen Wachstumstemperaturen ermittelt (BEUCHAT, 1986; BARRETT et al., 1988; GRIFFITHS u. PARK, 1990; MURRAY et al., 1999).

TOTTEN et al. (1987) wiesen erstmals Stämme von *C. jejuni* nach, die hippurat-negativ waren.

	C. jejuni	C. coli	C. lari	Arcobacter butzleri	Helicobacter pullorum
Oxidase	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+
Urease	---	---	---	---	---
Indoxylacetat-hydrolyse	+	+	---	+	---
Hippurat-hydrolyse	+	---	---	---	---
Sensibilität Nalidixinsäure	S	S	R	S	S
Sensibilität Cephalothin	R	S/R	R	R	R
Temperatur Optimum (°C)	42 - 43	42 - 43	42 - 43	25	42

Tab. 1: Phänotypische Eigenschaften

2.2.2. Serologie

Vorwiegend werden 2 Systeme, die auf der Hämagglutination beruhen, eingesetzt. Das System nach PENNER u. HENNESSY (1980) beruht auf thermostabilen Antigenen. Eine Unterscheidung von 60 Serovaren ist derzeit möglich.

Thermolabile Antigene bilden die Grundlage für die serologische Differenzierung nach LIOR et al. (1981).

Eine Serotypisierung von C.-Isolaten scheint unter klinischen und epidemiologischen Gesichtspunkten wenig aufschlussreich zu sein, da sich einerseits durch die Bestimmung des Serovars keine Hinweise auf die Pathogenität ergeben und andererseits die serologischen Eigenschaften eines C.-Stammes nicht stabil sind (CORBEIL et al., 1975; WESLEY u. BRYNER, 1989; MILLS et al., 1992; ZOELLNER u. WUTHE, 1993).

2.2.3. Molekulargenetik

Für epizootiologische Untersuchungen kann die Charakterisierung von Stämmen durch DNA-fingerprinting, das einen hohen Grad an Unterscheidung erlaubt, ergänzt oder ersetzt werden (VAN DER PLAS et al., 1994).

Auch der Einsatz einer PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism of Polymerase Chain Reaction) zur Differenzierung kann die Serotypisierung ergänzen und damit epidemiologische Studien auf molekularbiologischer Ebene stützen (AYLING et al., 1996).

Hierbei kommen sowohl Methoden basierend auf der 23S rRNA (FERMER u. ENGVALL, 1999) als auch auf der 16S rRNA (MARSHALL et al., 1999; VANNIASINKAM et al, 1999) zum Einsatz.

HANI u. CHAN (1995) entwickelten eine Methodik, basierend auf dem Hippuricase-Gen von *Campylobacter jejuni*, welche auch eine Detektion von hippuricasenegativen *C. jejuni* ermöglicht.

Die Pulsfeldgelelektrophorese ist eine weitere Methodik zur Typisierung der Gattung *Campylobacter* (STEELE et al., 1998).

Anhand des Fettsäuremusters kann mittels der Gaschromatographie eine Speziesdifferenzierung erfolgen (STEINBRUECKNER et al., 1999).

WASSENAAR u. NEWELL (2000) verglichen die möglichen molekulargenetischen Differenzierungsansätze für die Genotypisierung von *Campylobacter*.

PARKHILL et al. (2000) gelangten die Entschlüsselung des Genoms von *C. jejuni*.

2.3. Vorkommen und Bedeutung von *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter* beim Menschen

Über die Isolierung von *C. jejuni* im Zusammenhang mit dem Auftreten einer Diarrhoe wurde zuerst beim Kind berichtet (KING, 1957). Weitere Isolierungen aus Stuhlproben von an Diarrhoe erkrankten Menschen folgten und führten zu der Erkenntnis, dass diese *Campylobacter*spezies die Ursache einer schwer verlaufenden Enteritis des Menschen sein kann (SKIRROW, 1977a,b). Inzwischen ist gesichert, dass auch *C. coli* und *C. lari* Erreger einer *Campylobacteriose* des Menschen sind (TAUXE et al., 1985). Die Infektion führt beim Menschen zu wässrigem, mitunter blutigem Durchfall, selten auch zu Erbrechen. Dabei können Fieber, verbunden mit Kopf-, Rücken-, Glieder- und Leibschmerzen auftreten (SKIRROW, 1977a; JONES et al., 1980). Die *C. jejuni*-bedingte Enteritis kann Wochen später eine Affektion der Gelenke in Form einer Mono- oder Polyarthritits nach sich ziehen (WEBER, 1985).

Das grösste Risiko für den Menschen, sich mit *Campylobacter* zu infizieren, stellen Lebensmittel tierischer Herkunft dar. Dazu zählen der Genuss von unzureichend erhitztem Geflügelfleisch oder mangelnde Hygiene bei der Verarbeitung (HARRIS et al., 1986; STERN, 1992; HUMPHREY et al., 1993). So konnte in epidemiologischen Untersuchungen eine hohe Korrelation zwischen der Verarbeitung, dem Verzehr von Geflügelfleisch und einer Infektion mit *Campylobacter* nachgewiesen werden.

Bei den Isolaten der Gattung *Arcobacter* handelte es sich vorrangig um *A. butzleri*. Sowohl *A. butzleri* als auch *H. pullorum* konnten in Stuhlproben von an Enteritis erkrankten Menschen nachgewiesen werden (STEINBRUECKNER et al., 1997).

Eine Erregerübertragung durch Eier ist nicht bekannt (NOTERMANS, 1994).

Weitere Infektionsquellen können rohe Milch (HARRIS et al., 1987), Wasser, das nicht Trinkwasserqualität aufweist, aber auch Hunde und Katzen sein (KAPPERUD et al., 1993; HOPKINS et al., 1984).

YUKI (1997) konnte *C. jejuni* aus Patienten mit Guillain-Barré Syndrom isolieren. Hierbei handelt es sich um eine akut verlaufende neuromuskuläre Paralyse, die hauptsächlich in industrialisierten Ländern auftritt.

2.4. Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter beim Nutzgeflügel

Beim Vogel, einschliesslich des Wirtschaftsgeflügels, kommen die Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* vor.

94 % der isolierten Proben von WALLACE et al. (1997) konnten nach Biotypisierung als Spezies *C. jejuni* identifiziert werden. Bei 6 % handelte es sich um *C. coli*. Die Isolierungsrate von *C. coli* war in dieser Studie geringer als in vergleichbaren Studien. So lag die Isolierungsrate von *C. coli* in holländischen Betrieben bei 14 % (BAENFFER, 1985).

POKAMUNSKI et al. (1986) konnten in ihrer Arbeit 19 % *C. coli* isolieren.

Die Studie von RIVOAL et al. (1999) zeigte, dass sich 80 % der Geflügelisolate der Spezies *C. jejuni* und 20% der Spezies *C. coli* zuordnen liessen.

Geflügel ist häufig gesunder Träger von *Campylobacter*, welche im Kot in einer Menge von $10^5 - 10^9$ CFU / g nachgewiesen werden können (BERNDTSON et al., 1996).

C. jejuni befindet sich vorwiegend in der Schleimschicht der Blinddärme und Kloakenkrypten ohne pathologische Veränderungen des lokalen Darmgewebes zu verursachen.

Die Infektion findet meist nicht vor dem Alter von einer Woche statt, in den meisten Fällen sind die Tiere ab der 3. Woche infiziert (SMITHERMAN et al., 1984; HOOP u. EHRSAM, 1987).

Eine vertikale Übertragung wie auch die Durchdringung der Eischale durch *C. jejuni* hat keine Bedeutung. Futter spielt als Überträger von *Campylobacter* keine Rolle (NEILL et al., 1985; KALLOWA u. KALLOWA, 1989; HUMPHREY et al., 1993; JACOBS-REITSMA et al., 1995; PEARSON et al., 1996; GREGORY et al., 1997).

Einmal infizierte Herden bleiben bis zur Schlachtung C.-positiv. Werden *Campylobacter* in eine Herde eingeschleppt, sind innerhalb einer Woche alle Tiere kolonisiert und bleiben bis zur Schlachtung C.-positiv (JAKOBS-REITSMA et al., 1995).

Wenn *C. jejuni* in einer Herde vorhanden ist, dann findet man den Erreger auch in der Einstreu und im Futter. Koprophagie erklärt z.T. die rasche Übertragung innerhalb der Herde. Die Virulenz des Erregers kann durch schnelle Passagen in den Kücken gesteigert werden (SANG et al., 1989).

Da *Campylobacter* in der Umgebung von Stallungen immer wieder längere Zeit überleben kann, findet von dort ein horizontaler Eintrag in Geflügelherden statt (HOOP u. EHRSAM, 1987; VAN DE GIESSEN et al., 1998).

Die *Campylobacter*-Infektion scheint nicht über eine Persistenz des Erregers im Stall von einer Herde auf die nächste übertragen zu werden (JACOBS-REITSMA et al., 1995).

Da sich in den Herden verschiedene Serotypen nachweisen liessen und dieses Muster auch immer wieder wechselte, spricht JAKOBS-REITSMA et al. (1995) von einem konstantem Fluss neuer Infektionen.

Grösste Bedeutung werden der Desinfektion von Schuhen in geeigneten Desinfektionswannen beigemessen, da die Infektion mit verunreinigten Schuhen sehr leicht im Bestand übertragen werden kann (HUMPHREY et al., 1993; BERNDTSON, et al., 1996; VAN DE GIESSEN et al., 1996; GREGORY et al., 1997). Der Gebrauch von Desinfektionsbädern für Schuhe verzögerte die Zeit bis zur Infektion ganz wesentlich. Das Desinfektionsmittel in der Wanne sollte einmal wöchentlich erneuert werden (GREGORY et al., 1998; EVANS u. SAYERS, 2000).

Campylobacter kann im Trinkwasser überleben (KAPPERUD et. al., 1993) und hält sich gut in verschiedenen Haustieren, Nagern, Insekten sowie Betreuungspersonal (HOOP u. EHRSAM, 1987; HUMPHREY et al., 1993; GREGORY et. al., 1997).

Infektionsquellen für die Herden können auch Personal und Gerätschaft, z.B. bei fraktionierter Schlachtung sein (JACOBS-REITSMA et al., 1994; BERNDTSON et al., 1996; VAN De GIESSEN et al., 1998).

Deponien von toten Hühnern in der Nähe von Stallungen sind als Risikofaktor einzustufen (EVANS u. SAYERS, 2000).

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zum Auftreten der Campylobacter-Infektion zu verschiedenen Jahreszeiten. Einige Autoren berichten vom gehäuftem Vorkommen im Sommer und Herbst (JACOBS-REITSMA et al., 1994; STERN, 1995), während andere keinen jahreszeitlichen Einfluss feststellen konnten (HUMPHREY et al., 1993).

Ein schlechter Hygienestandard in den Herden fördert die Infektion von C. (HOOP u. EHRSAM, 1987).

Mehrere Autoren sind sich darin einig, dass die Verbesserung bzw. strikte Einhaltung von Hygienemassnahmen eine Reduktion von Campylobacter spp. in den Mastherden bringt (GREGORY et al., 1997; VAN De GIESSEN et al., 1998; EVANS u. SAYERS, 2000).

Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion bestand kein Hinweis auf in der Umgebung überlebende C. (EVANS u. SAYERS, 2000).

Die Gabe von Bakterienkulturen sowie von bestimmten Kohlehydraten (z.B. Laktose, Mannose) hatten einen positiven Effekt auf die Reduktion von Campylobacter in den Geflügelherden (SCHOENI u. DOYLE, 1992; SCHOENI u. WONG, 1994).

Es wurden eigene Bakterienpräparate entwickelt, die eine grosse Anzahl von in der Schleimschicht des Darmes lebenden Bakterien enthalten (STERN, 1994).

ATABAY et al. (1998a,b) gelangen in ihren Studien die Isolierung von Arcobacter butzleri und Helicobacter pullorum von rohem Geflügelfleisch.

In Leber, Duodenum und Caecum von Mastgeflügel und Legehennen konnten STANLEY et al. (1994) das Vorkommen von Helicobacter pullorum nachweisen.

2.5. Vorkommen und Bedeutung von Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter bei verschiedenen Haustieren

Wirtschaftsgeflügel, Wildvögel, Schweine, Schafe, Rinder, Hunde, Katzen und zahlreiche andere Tierarten können die Erreger Campylobacter, Arcobacter und Helicobacter im Intestinaltrakt beherbergen, in den meisten Fällen ohne klinische Symptome (CHATTOPADHYAY, 1991; STANLEY et al., 1994; ATABAY et al., 1998a,b).

GEBHART et al. (1985) gelangen der Nachweis von *C. hyointestinalis* in Schweine- und Rinderkot. Weiters beschrieben ATABAY u. CORRY (1998) das Vorkommen von *C. fetus*, *C. hyointestinalis* und *C. jejuni* im Kot von Rindern.

Schwein, Rind und Schaf sind häufig latente Träger von *C. jejuni* (WEBER, 1985), welchem bei diesen Tieren eine Beteiligung an Durchfallerkrankungen und Aborten zugeschrieben wird.

Bei klinisch gesunden Pferden wurde *C. jejuni* nicht nachgewiesen, konnte aber aus Kotproben von Fohlen mit akuten Durchfällen isoliert werden (WEBER u. SCHMITTDIEHL, 1988).

C. coli kommt beim Schwein, ohne besondere Krankheitssymptome zu verursachen, besonders häufig vor (ROSEF et al., 1983; MUNROE et al., 1983). Bei Rindern kann diese Bakterienspezies aus an Enteritis erkrankten und gesunden Tieren etwa gleich häufig isoliert werden (WEBER u. SCHMITTDIEHL, 1988).

GLÜNDER u. PETERMANN (1989) gelang die Isolierung von *C. lari* aus Silbermöwen und Dreizehenmöwen.

60% aller Hunde aus Tierheimen und 24,7% aus Privathaushalten waren Träger von *C.* (BALUCINSKA et al., 1997).

3. Material und Methode

3.1. Art der Proben

3.1.1. Betriebe

Für die erste Untersuchungsreihe (Durchgang) in den Geflügelmastbetrieben wurden in Zusammenarbeit mit den Betreuungstierärzten 100 Landwirte ausgewählt, die freiwillig an diesem Projekt teilnahmen. Die Anzahl der untersuchten Betriebe in den einzelnen Bundesländern entsprach etwa der prozentuellen Verteilung der tatsächlichen Produktion (Tab. 2).

Untersuchte Betriebe/ Herden nach Bundesländern		
Bundesland	Betriebe	Herden
NÖ	37	87
OÖ	9	20
K	22	29
ST	32	69
Gesamt	100	205

Tab. 2: Anzahl der untersuchten Betriebe in den einzelnen Bundesländern
(1.Durchgang, n=100)

Für die Durchgänge 2, 3 und 4 war nur eine verringerte Anzahl von Betrieben, die schon im ersten Durchgang untersucht worden waren, vorgesehen (Tab. 3).

Durchgang	Anzahl der Betriebe	Anzahl der Herden
1	100	205
2	48	91
3	39	74
4	34	70

Tab. 3: Anzahl der untersuchten Betriebe je Durchgang

Mittels Fragebogen wurden bei den 100 Betrieben im 1. Durchgang die wichtigsten Betriebs- und Stalldaten erhoben. Leider konnten sichere Daten zur Anwesenheit anderer Tiere in den Betrieben nur von 77 Betrieben verwertet werden. Das Probenentnahmeblatt wurde bei jedem Betriebsbesuch in allen vier Durchgängen ausgefüllt.

3.1.2. Fragebogen

Der Fragebogen war in drei wesentliche Teile gegliedert:

1. Betriebsbezogene Daten
2. Stallbezogene Daten
3. Herdenbezogene Daten (Probenentnahmeblatt)

Betriebsbezogene Daten

1. Anzahl der Mastplätze am Betrieb?
2. Anzahl der Stallungen?
3. Anzahl der Tiere je Stalleinheit?
4. Werden am Betrieb unterschiedliche Altersgruppen gehalten?
5. Ist die Anzahl der eingestellten Tiere je Mastdurchgang gleich?
6. Werden am Betrieb noch andere Haus- oder Nutztiere gehalten - wenn ja - welche?

Stallbezogene Daten

1. Wann wurden die Stallungen errichtet?
2. Art des Tränkesystems in den Stallungen?
3. Futterversorgung?
4. Werden eigene Stallmäntel und Stallschuhe verwendet?
5. Ist eine Desinfektionswanne vor den Stallungen vorhanden und auch mit Desinfektionsmittel gefüllt?
6. Ist ein Stallvorraum vorhanden?
7. Vorhandensein von Nagern, Bekämpfung?
8. Vorhandensein von Fliegen, Bekämpfung?
9. Art der Wasserversorgung am Betrieb?
10. Verwendetes Einstreumaterial?

Herdenbezogene Daten (Probenentnahmeblatt)

1. Betriebsnummer
2. Herdennummer
3. Datum der Probennahme
4. Alter der Tiere
5. Art der Probe

3.1.3. Probensammlung

Die Probensammlung in den Betrieben erfolgte unter Verwendung von Einwegmänteln, Plastiküberschuhen und Handschuhen aus Latex oder Kunststoff. Saubere Plastiksäcke in

verschiedenen Grössen dienten als Transportbehältnisse für das gesammelte Material. Noch am Betrieb wurden alle dort gezogenen Proben mit einem eigens dafür vorgesehenen Gerät gemeinsam in eine Plastikhülle eingeschweisst, um mögliche Querkontaminationen beim Transport zu verhindern. Die Beschriftung der Proben wurde mit Permanent-Markern durchgeführt.

3.1.4. Transport

Zum Transport in das Labor wurden im Fahrzeug Kühlboxen mit integrierten Kühlaggregaten verwendet. Die Vorkühlung erfolgte mit Kühlpatronen.

3.1.5. Auswahl der Betriebe für den ersten Untersuchungsdurchgang

Die Auswahl der 100 Betriebe für die erste Untersuchungsreihe erfolgte rein zufällig und ohne Berücksichtigung von Betriebsgrösse oder Betriebsstruktur. Bezogen auf die Mastplätze und die Anzahl der einzelnen Stallungen je Betrieb ergaben sich Verteilungen für den ersten Untersuchungsdurchgang, die in den Tab. 4 und Tab. 5 dargestellt sind.

	Anzahl der Mastplätze gesamt					
	0001-10.000	10.001-20.000	20.001-30.000	30.001-40.000	40.001-100.000	über 100.000
Anzahl der Betriebe im 1. Durchgang	20	26	27	11	15	1

Tab. 4: Anzahl der untersuchten Betriebe im Zusammenhang mit der Betriebsgrösse

	Anzahl der Stallungen (Herden)/Betrieb					
	1	2	3	4	5	6
Anzahl der Betriebe im 1. Durchgang	41	32	10	16	0	1

Tab. 5: Anzahl der untersuchten Betriebe im Zusammenhang mit der Anzahl der Stallungen

Die erste Untersuchungsreihe dauerte vom 24. Juli 1998 bis 30. Juli 1999. Die Fragebögen wurden mit den Landwirten vor Ort ausgefüllt. Anschliessend wurden Sammelkotproben von den eingestellten Herden entnommen. Im ersten Durchgang wurden 205 Herden getestet.

3.1.6. Auswahl der Betriebe für den zweiten, dritten und vierten

Untersuchungsdurchgang

Aus den 100 Betrieben zu Projektbeginn, wurde eine Mindestanzahl von vierzig Betrieben festgelegt, die für die drei weiteren Untersuchungsreihen zur Verfügung stehen sollten. Zwanzig Mastgeflügelhalter, mit C.-positiven Herden aus der ersten Runde wurden ohne Auswahlverfahren übernommen, der fehlende Rest wurde aus den verbleibenden 80 Betrieben per Zufall gezogen (Tab. 6).

Betriebliche Probleme, vor allem in Ober- und Niederösterreich, brachten Einschränkungen in der Kontinuität der Probenziehung während des 2., 3. und 4. Durchgangs. Die Anzahl der untersuchten Betriebe war aus diesem Grund bei den Untersuchungsreihen nicht gleich. Es wurden in den drei Durchgängen immer die selben Betriebe untersucht.

Durchgang	Besuchte Betriebe	Untersuchungszeitraum	
		von	bis
2	48	10.02.2000	04.07.2000
3	39	27.07.2000	07.10.2000
4	34	07.09.2000	24.01.2001

Tab. 6: Anzahl der besuchten Betriebe in den einzelnen Untersuchungszeiträumen (Durchgängen)

3.1.7. Erweiterter Probenziehungsplan für den zweiten bis vierten Untersuchungsdurchgang

Hier wurde die Probenziehung im Hinblick auf mögliche Eintragsquellen erweitert.

1. Sammelkotproben aus den Masthühnerherden
2. Wasserproben
3. Futterproben
4. Einstreuproben
5. Kotproben von am Betrieb gehaltenen Nutztieren
6. Kotproben von Haustieren
7. Nagetiere und deren Kotproben
8. Fliegen
9. Käfer
10. Wischtupfer

3.1.8. Probenziehung

Sammelkotproben aus den Masthühnerherden

Die Entnahme der Sammelkotprobe erfolgte in allen vier Untersuchungsreihen auf die gleiche Weise. Da nur Herden mit über 500 Tieren untersucht wurden, war die Anzahl der Einzelproben je Herde mit 60 festgelegt.

Es wurden Einwegmäntel vor dem Betreten des Stalles bzw. der Vorräume übergezogen. Die Verwendung von Plastiküberschuhen war obligatorisch. Bei mehreren Stalleinheiten an einem Betrieb wurden Überschuhe und Mäntel für jeden Stall gewechselt. Gebrauchte Überkleidung verblieb stets am Betrieb. Das Einsammeln der Kotproben erfolgte unter Zuhilfenahme von Einweghandschuhen in Plastiksäcke, die mit der Betriebsnummer und der Stallbezeichnung beschriftet waren.

Die Proben wurden in gekühltem Zustand in das Labor transportiert.

Wasserproben

Die Wasseruntersuchung wurde nur bei Betrieben durchgeführt, die Wasser nicht aus der öffentlichen Wasserversorgung, sondern aus eigenen Hausbrunnenanlagen bezogen (Tab. 7). Als Behältnis dienten sterile Einliter-Mehrweggebinde. Die Entnahme der Probe erfolgte

immer ausserhalb des Stallgebäudes, in Vorräumen, Waschküchen oder anderen Betriebsräumen. Nach kurzem Vorlauf wurde die Flasche gefüllt, danach verschlossen, mit der Betriebsnummer beschriftet und gekühlt in das Labor transportiert.

Art der Wasserversorgung	Anzahl der Betriebe (n=100)
Hausbrunnen	70
Öffentliche Wasserleitung	19
Gemischte Wasserversorgung	11

Tab. 7: Art der Wasserversorgungssysteme laut Fragebogen

Die Verteilung der Wasserversorgungssysteme in den Betrieben differiert zum 1. Durchgang, da sich im Verlauf der Studie die Situation in den Betrieben geändert hat.

Zur Versorgung der Tiere mit Wasser in den Stallungen waren Cups, Nippel- oder Rundtränken vorgesehen (Tab. 8). In der Regel sind die **Tränkesysteme** in den Betrieben mit mehreren Stallungen einheitlich.

Tränkesystem	Anzahl der Betriebe (n=100)
Nippel	84
Rundtränken	12
Cups	4

Tab. 8: Anzahl der verschiedenen Tränkesysteme betriebsbezogen laut Fragebogen

In den Durchgängen 2 bis 4 wurden 87 Wasserproben gezogen (Tab. 9).

Durchgang	Anzahl der untersuchten Wasserproben (n=87)
2	34
3	29
4	24

Tab. 9: Anzahl der untersuchten Wasserproben in den Durchgängen 2 – 4

Futterproben

Im 2., 3. und 4. Durchgang wurden 117 Futterproben aus allen besuchten Betrieben untersucht (Tab. 10). Die Probennahme ausserhalb der Stallungen war nur bei Fütterungssystemen möglich, die zwischen Silo und Stall entweder über einen offenen Vorlaufbehälter verfügten, oder direkt über einen Anhänger die Futteranlage befüllt wurde. Die Vorlaufeinrichtungen befanden sich immer in einem an die Stallungen direkt angrenzenden Vorraum. Bei geschlossenen Anlagen konnte eine Entnahme aus den Vorlaufbehältern im Stall durchgeführt werden.

Es wurde etwa ein Kilogramm von frisch aus dem Einfüllrohr nachgelaufenem Futter mit Einweghandschuhen entnommen und in einen neuen Plastiksack eingefüllt. Ein Kontakt mit dem Stallstaub konnte so ausgeschlossen werden. Der Transport in das Labor erfolgte in gekühltem Zustand.

Durchgang	Anzahl der untersuchten Futterproben (n=117)
2	47
3	38
4	32

Tab. 10: Anzahl der untersuchten Futterproben in den Durchgängen 2 - 4

Einstreuproben

Als Einstreumaterial wurden in den untersuchten Stallungen entweder gehäckseltes Stroh oder frische Hobelscharten verwendet (Tab. 11). Nur in 12 Betrieben kamen beide Materialien gleichzeitig zur Anwendung. In diesen Fällen wurden zuerst eine dünne Schicht Hobelscharten auf den Estrich aufgebracht und anschliessend Stroh bis zu einer Höhe von 10 bis 15 cm dazugestreut.

Einstreumaterial	Anzahl der Betriebe (n=80)
Stroh	58
Hobelscharten	30
Hobelscharten und Stroh gemischt	12

Tab. 11: Verwendetes Einstreumaterial betriebsbezogen laut Fragebogen

Die Verteilung der verwendeten Einstreumaterialien in den Betrieben differiert zum 1. Durchgang, da sich im Laufe der Studie die Situation in den Betrieben geändert hat.

Im 2., 3. und 4. Durchgang wurden 105 Einstreuproben auf C. untersucht.

Nicht in allen Betrieben wurde das Einstreumaterial direkt am Betrieb gelagert. Waren Stroh oder Hobelscharten vorhanden, erfolgte die Probenziehung mittels Einweghandschuhen an mehreren Stellen des Lagers. Die in einem grösseren Plastiksack zu einer Sammelprobe vereinigten Einzelproben wurden gekühlt in das Labor transportiert.

Ein von der Aussenwelt gut abgeschlossenes Lager für Einstreumaterialien gab es in keinem der Betriebe. Das Eindringen von Katzen, Nagern, Käfern und Insekten in die Lagerräume war überall möglich. Feuchte Stellen durch Schäden in den Dächern oder undichte Wände konnten nicht festgestellt werden.

Kotproben von am Betrieb gehaltenen Nutztieren

In 77 Betrieben konnten Daten betreffend Haltung von Nutztieren mittels Fragebogen erhoben werden (Tab. 12).

Im Rahmen der 2., 3. und 4. Untersuchungsreihe wurden von am Betrieb befindlichen Nutztieren stichprobenweise Kotproben entnommen. Schweine, Rinder, Wassergeflügel, Pferde und Legehennen konnten so auf das Vorhandensein von *Campylobacter* untersucht werden (Tab. 13).

Nutztierart	Anzahl der Betriebe n=77
Schweine	49
Rinder	31
Wassergeflügel	3
Legehennen	7
Puten	2
Ziegen	2
Pferde	5
Rotwild	1

Tab. 12: Häufigkeit der in den Betrieben gehaltenen Nutztiere

Nutztierart	Anzahl der Kotproben (DG = Durchgang)			
	DG2	DG3	DG4	gesamt
Schweine	15	22	19	56
Rinder	14	11	9	34
Wassergeflügel	-	-	1	1
Legehennen	3	3	2	8
Pferd	2	-	1	3

Tab. 13: Anzahl der untersuchten Kotproben von am Betrieb gehaltenen Nutztieren
(Durchgang 2 bis 4)

Kotproben von Haustieren

Kot von Hunden oder Katzen war in den Stallungen oder Vorräumen bei keinem Betriebsbesuch zu finden. Bei der Sammlung von Probenmaterial musste immer das Betriebsgelände miteinbezogen werden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum bestand die Population an Hunden und Katzen in der Regel aus den selben Tieren (Tab. 14).

Mit Einweghandschuhen wurde das Probenmaterial in Plastiksäcke gefüllt und gekühlt in das Labor transportiert.

Haustierart	Anzahl der Betriebe n=77	Anzahl der untersuchten Proben (DG = Durchgang)		
		DG2	DG3	DG4
Hund	43	10	5	5
Katze	56	12	2	1

Tab. 14: Anwesenheit von Hunden und Katzen in den Betrieben und Anzahl der untersuchten Kotproben, 2. - 4. Durchgang

Nagetiere

Tote Nagetiere oder Nagetierkot wurden mit Einweghandschuhen in einen beschrifteten Plastiksack verbracht und gekühlt in das Labor transportiert.

Fliegen

War ein Fangen von Insekten möglich, wurden sie in Plastiksäcken verbracht und in das Labor transportiert.

Käfer

Lebende und tote Käfer wurden mit Einweghandschuhen in Plastiksäcke verbracht und gekühlt in das Labor transportiert (Tab. 15).

	Nager/Nagerkot	Fliegen	Käfer
Anzahl der untersuchten Proben	5	6	10

Tab. 15: Anzahl der untersuchten Nager- Fliegen- und Käferproben im 2. bis 4. Durchgang

Wischtupfer

Der erweiterte Probenziehungsplan im 2., 3. und 4. Durchgang umfasste auch Wischtupfer von Vorräumen, Desinfektionswannen und Belüftungssystemen.

Das Tupfermaterial wurde mit destilliertem Wasser befeuchtet. Nach der Probennahme wurden die Tupfer in Plastiksäcke verbracht, welche in einen beschrifteten Plastiksack verbracht wurden. Der Transport ins Labor erfolgte gekühlt.

Vorraumtupfer

Mit dem Tupfermaterial wurde unter besonderer Berücksichtigung von schmutzigen und feuchten Stellen über Boden- und Wandflächen, Fensterbänke, Waschbecken, Möbelstücke und technischen Geräten gewischt (Tab. 16).

Durchgang	Anzahl der untersuchten Vorraumtupfer
------------------	--

2	56
3	49
4	43

Tab. 16: Anzahl der untersuchten Vorraumtupfer in den Durchgängen 2 – 4

Desinfektionswannen

Die Tupfer wurden in die Wannen eingetaucht.

Alle befüllten Wannen wurden untersucht (Tab. 17).

Durchgang	Wanne nicht vorhanden	Wanne vorhanden nicht befüllt	Wanne vorhanden befüllt und untersucht	Gesamt
2	31 34%	39 43%	21 23%	91 100%
3	23 31%	34 46%	17 23%	74 100%
4	19 27%	21 30%	30 43%	70 100%

Tab. 17: Unterschiedliche Verwendung von Desinfektionswannen während der Durchgänge 2 – 4, auf Stallungen bezogen

Belüftungssystem

Mit dem befeuchteten Tupfermaterial wurden Zuluftklappen und Ansaugvorrichtungen an mehreren zugänglichen Stellen abgewischt (Tab. 18).

Durchgang	Anzahl der untersuchten Belüftungswischtupfer
2	30
3	20
4	15

Tab. 18: Anzahl der untersuchten Belüftungswischtupfer in den Durchgängen 2 - 4

3.2. Aufarbeitung der Proben

3.2.1. Kulturverfahren

Feste Nährmedien

Zum Einsatz kam modifizierter CCDA-Nährboden nach Preston (Basis: Oxoid, Hampshire, UK, CM739 mit Zusatz von CCDA Selektiv Supplement Oxoid SR155E) Dieser Agar besitzt die Eigenschaft, die Begleitflora gut zu unterdrücken und das Wachstum von Campylobacter

spp. nicht zu behindern. Er wird von zahlreichen Autoren (STERN, 1992; CORRY et al., 1995) empfohlen und ist in der Methode nach ISO 10272:1995 sowie im FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A (1998) beschrieben.

Das Supplement SR155E enthält:

Cefoperazon	16 mg = 32 mg / Liter Medium
Amphotericin	B5 mg = 10 mg / Liter Medium

Flüssige Nährmedien

Verwendet wurde Preston - Medium, wie von GRIFFITH u. PARK (1990) und WEIJTENS et al. (1997) für die Anreicherung (Oxid Nutrient Broth No. 2 mit Zusatz von Campylobacter Selektiv Supplement Oxoid SR117E und lysiertem Pferdeblut) sowie gepuffertes Peptonwasser (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA, 1.07228) für die Aufschwemmung empfohlen.

Das Supplement SR117E enthält:

Polymyxin B	2500 I.U.
Rifampicin	5 mg
Trimethoprim	5 mg
Cycloheximide	50 mg

Mikroaerobes Milieu

Campylobacter benötigen ein sauerstoffreduziertes Milieu (mikroaerob), welches mittels Generatoren (Genboxmicroaer bioMérieux 96 125) in speziellen, luftdicht verschliessbaren Boxen (Genbox Jarre der Firma bioMérieux) hergestellt wurde.

Bebrütungstemperatur und -dauer

Eine optimale Bebrütungstemperatur für thermophile Campylobacter von 42° C – 43° C wurde eingehalten.

Die Bebrütungsdauer der Preston-Anreicherung betrug 24 Stunden. Danach erfolgte der Ausstrich auf CCD-Agar, Bebrütungsdauer 48 Stunden.

3.2.2. Probenverarbeitung

Kotproben

587 Kotproben gelangten zur Untersuchung.

Zwei haselnussgrosse Stücke jeder Kotprobe wurden in einem Röhrchen mit Peptonwasser und parallel dazu in einem Röhrchen mit Prestonmedium aufgeschwemmt.

Die Proben in Peptonwasser wurden direkt auf CCD-Agar ausgestrichen.

Wasserproben

87 Wasserproben wurden untersucht.

Die Wasserproben wurden durch Filter mit einer Porengrösse von 0,2 µm filtriert.

Das Filtermaterial wurde auf CCD-Agar aufgebracht und bebrütet.

Futterproben

Zur Untersuchung gelangten 117 Futterproben.

20 – 25 g der Futterproben wurden in Stomacher-Säcken eingewogen und mit 50 ml Prestonmedium homogenisiert. Hiervon wurden 10 ml entnommen und 24 Stunden bebrütet.

Danach erfolgte der Ausstrich auf CCD-Agar.

Einstreuproben

105 Einstreuproben wurden einer Untersuchung unterzogen.

15 – 20 g der Einstreuproben wurden in Stomacher-Säcken eingewogen und mit 50 ml Prestonmedium gut durchmischt. Hiervon wurden 10 ml entnommen und 24 Stunden bebrütet.

Danach erfolgte der Ausstrich auf CCD-Agar.

Wischtupfer

266 Wischtupfer wurden untersucht.

Die Wischtupfer wurden mit einer sterilen Pinzette aus den Transportbehältnissen genommen und in 20 ml Prestonmedium angereichert. Nach 24 Stunden erfolgte der Ausstrich auf CCD-Agar.

Nagetiere und Insekten

Zwei tote Mäuse, drei Mäusekotproben sowie 16 Insekten gelangten zur Untersuchung.

Der Darmtrakt von Nagetieren sowie die Insekten wurden in 20 ml Prestonmedium angereichert. Nach 24 Stunden erfolgte der Ausstrich auf CCD-Agar.

3.2.3. Identifikation von Campylobacter

Eine makroskopische Beurteilung der Platten erfolgte nach 48-stündiger Bebrütung.

Mittels Phasenkontrastmikroskop wurden die morphologischen Eigenschaften aller Isolate bei einer 1000-fachen Vergrößerung festgestellt. Anschliessend erfolgte eine Subkultivierung auf CCD- und Blutagar. Die Aufbewahrung erfolgte bei – 80° C in Kryoröhrchen.

3.3. Differenzierung der Isolate

3.3.1. Biochemische Stammdifferenzierung

Der biochemischen Stammdifferenzierung wurden alle isolierten Stämme der 2., 3. und

4. Untersuchungsdurchgänge (n=145) unterzogen.

Oxidase

Da alle Organismen der Gattung Campylobacter Oxidase-positiv sind, wurde diese biochemische Reaktion zu Beginn der Typisierung zur näheren Einschränkung durchgeführt (HOLT et al., 1994).

Katalase

Die im Rahmen dieses Projektes relevanten Campylobacter C. jejuni, C. coli, C. lari, sind Katalase-positiv.

Daher wurde die Erhebung dieses phänotypischen Merkmales zur weiteren Absicherung der Diagnose verwendet (BARRETT et al., 1988).

Indoxylacetathydrolyse

Dieses biochemische Verfahren detektiert C. jejuni, C. coli und Arcobacter butzleri. Es trennt die zuvor genannten folglich von C. hyointestinalis, C. fetus, C. lari und H. pullorum ab (POPOVIC-UROIC et al., 1990).

Hippurathydrolyse

Die Durchführung der Hippurathydrolyse lässt anhand einer positiven Farbreaktion eine Identifizierung der C. jejuni-Isolate zu. So können diese von C. coli und C. lari unterschieden werden (NICHOLSON u. PATTON, 1995).

Sensibilität gegen Nalidixinsäure

Die Prüfung der Empfindlichkeit von Campylobacter spp. gegen zwei spezielle Antibiotika, Nalidixinsäure und Cephalothinsäure, gilt als weiterer Differenzierungsparameter.

C. jejuni, C. coli und H. pullorum sind sensibel gegen Nalidixinsäure, während C. hyointestinalis, C. fetus sowie C. lari und A. butzleri keine Bildung eines Hemmhofes zeigen, folglich als resistent gelten.

Die Erstellung der Antibiogramme und die Abmessung der Hemmhofgröße erfolgten nach den NCCL guidelines (National Comitee for Clinical Laboratory Standards, 1999)

Die Bewertung der Sensibilität entsprach den Empfehlungen von BAUER et al.(1966).

Sensibilität gegen Cephalothin

C. hyointestinalis sowie C. fetus reagieren sensibel gegen Cephalothin.

C. coli kann sowohl sensibel als auch resistent gegen Cephalothin sein.

Keinen Hemmhof bilden C. jejuni, C. lari, A. butzleri und H. pullorum aus, d.h. sie sind resistent.

Die Durchführung der Sensibilitätsprüfung erfolgte analog zu jener der Nalidixinsäure.

3.3.2. Molekulargenetische Stammdifferenzierung

Die 58 Isolate des 1. sowie die 145 Isolate des 2. – 4. Untersuchungsdurchganges wurden der molekulargenetischen Stammdifferenzierung unterzogen.

Um eine zuverlässige Abgrenzung von Campylobacter spp. zu A. butzleri und H. pullorum zu gewährleisten, wurde zunächst eine Polymerase-Chain-Reaction-Methode (PCR) basierend auf der 16S rRNA (modifiziert nach VANNIASINKAM. et al., 1999) etabliert.

Darauf aufbauend wurden mittels Restriktionsenzymen (MARSHALL et al.,1999) und einer weiteren PCR-Technik (HANI u. CHAN, 1995) Campylobacter spp. differenziert.

Vorversuche zur molekulargenetischen Differenzierung

Alle genannten Versuche wurden mit folgenden Referenzstämmen (National Collection for Typing Culture, London) durchgeführt:

- *C. fetus* (NCTC 10842)
- *C. hyointestinalis* (NCTC 11608)
- *C. jejuni* ss. *jejuni* (NCTC 11626)
- *C. jejuni* ss. *doylei* (NCTC 11924)
- *C. coli* (NCTC 12143)
- *C. lari* (NCTC 12144)
- *C. jejuni* ss. *jejuni* (NCTC 12145)
- *A. butzleri* (NCTC 12481)
- *C. jejuni* ss. *jejuni* (NCTC 12744)
- *H. pullorum* (NCTC 12824)

DNA-Extraktion:

Die tiefgefrorenen Referenzstammkulturen wurden aufgetaut. Die DNA-Extraktion wurde zunächst mit der Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt (SAMBROOK et al., 1989).

Diese aufwendige Methode wurde durch eine Extraktionstechnik auf Silikatbasis, High Pure PCR Template Preparation Kit, ersetzt (BOOM et al., 1990; LAWSON et al., 1998).

PCR-Technik:

a) Direkte PCR

Nach Vergleich der 16S rRNA verschiedenster *Campylobacter* spp., *Helicobacter* spp. und *Arcobacter* spp. wurde ein direkter PCR-Nachweis aufgebaut, welcher eine zuverlässige Erfassung von *Campylobacter* spp. abgrenzend zu *Helicobacter* spp. und *Arcobacter* spp. ermöglicht.

b) Typisierung *Campylobacter* spp. auf molekulargenetischer Ebene

- PCR – RFLP mit RSAI

Die amplifizierten Gensequenzen wurden mit RSAI geschnitten. Somit konnten *Campylobacter* spp., *Arcobacter* und *Helicobacter* in folgende Gruppen unterteilt werden :

Gruppe A: *C. jejuni*, *C. coli*

Gruppe B: *C. lari*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*

Gruppe C: *A. butzleri*

Gruppe D: *H. pullorum*

- PCR (Hippuricasegen)

Diese Methode ermöglicht eine eindeutige Differenzierung innerhalb der Gruppe A, d.h. Erfassung auch hippuratnegativer *C. jejuni* (TOTTEN et al.,1987).

- PCR – RFLP mit ECO RV

Diese Methode ermöglicht eine eindeutige Differenzierung innerhalb der Gruppe B, d.h. Abgrenzung von *C. lari* zu *C. hyointestinalis* und *C. fetus*.

3.3.3. Vidas-System

Mit dieser Methode wurden 140 Geflügelkotproben untersucht.

Prinzip des VIDAS-Systems

Das Vidas-System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) ist besonders in Qualitätskontroll-Laboratorien der Lebensmittelindustrie in Verwendung. Das System basiert nicht auf dem Nachweis von Keimwachstum und kommt somit ohne Kulturmedien oder Nährböden aus. Ähnlich dem ELISA-Test-Prinzip werden hier Erreger (*Salmonellen*, *Listerien*, *Campylobacter*, etc.) mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Eine angekoppelte Fluoreszenzreaktion macht diese Reaktion messbar.

Funktionsweise des Gerätes

An der Wand eines pipettenspitzenförmigen Reaktionsträgers (SPR, Abb. 2, links), befinden sich monoklonale Antikörper gegen *Campylobacter* Spezies-Flagellar-Antigen. Der Teststreifen (CAM, Abb. 2, rechts) selbst beinhaltet Waschpuffer und Reagenzien für die Fluoreszenz-Reaktion. Wird ein Testdurchgang gestartet, so saugt das Gerät die Probenflüssigkeit mit dem SPR an, und die im Probenmaterial vorhandenen Antigene bleiben an der Wand haften. Es erfolgen einige Waschschrte, die das Gerät automatisch durchführt und anschliessend die Fluoreszenzreaktion. Am Ende des Testdurchganges wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Das Gerät vergleicht selbständig die Werte der Probe mit dem

Standard des Gerätes. Dieser Standard wird in 14-tägigem Abstand kalibriert (2 mal Standard, Positiv- und Negativprobe) und gibt nur jene Proben als positiv aus, die über einem berechneten Schwellenwert liegen.



Abb. 1: Mini VIDAS

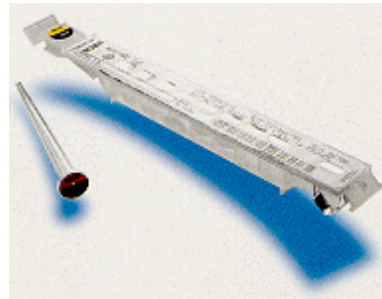


Abb. 2: links SPR, rechts CAM Teststreifen

3.3.4. Gaschromatographie

Aus dem ersten Untersuchungsdurchgang wurden 20 Isolate, die aufgrund ihres biochemischen Verhaltens nicht eindeutig der Gattung *Campylobacter* zugeordnet werden konnten, mittels Gaschromatographie spezifiziert. Diese Untersuchung wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg, Prof. Dr. Manfred Kist durchgeführt.

3.4. Statistische Auswertung

Zur Auswertung bzw. Darstellung der Ergebnisse wurden folgende Verfahren verwendet:

- Chi-Quadrat-Test
- Mc-Nemar-Test
- Kontingenzkoeffizient
- Kappa

Die statistische Analyse erfolgte in Anlehnung an SACHS (1997) mit SPSS 9.0 für Windows (©SPSS Inc. 1989 – 1999).

4. Ergebnisse und Diskussion

203 Isolate der 1. – 4. Untersuchungsdurchgänge wurden aufgrund des Kulturwachstums (ISO 10272 : 1995; FDA Bacteriological Analytic Manual, 8th Edition, Revision A, 1998) und der Phasenkontrastmikroskopie als Campylobacter-positiv erkannt und bei – 80°C aufbewahrt (WEIJTENS et al., 1997).

4.1. Ergebnisse des ersten Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt

Im 1. Untersuchungsdurchgang wurden Sammelkotproben von 205 Mastgeflügelherden auf Campylobacter untersucht.

Von diesen Sammelkotproben wurden mittels Kultur und anschließender phänotypischer Beurteilung 58 Isolate als Campylobacter identifiziert. Diese 58 Isolate wurden mit der Direkten PCR überprüft.

In 47 Fällen konnte das Kulturergebnis bestätigt werden. Die verbleibenden 11 Fälle konnten nach gaschromatographischer Untersuchung der Spezies *H. pullorum* zugeordnet werden.

Die Ergebnisse der Direkten PCR und der gaschromatographischen Untersuchung sind in Tab. 19 dargestellt.

Probenmaterial	Anzahl der untersuchten Proben	Anzahl der C.-positiven Proben	Anzahl der C.-negativen Proben	Anzahl der H. pull.-positiven Proben
Sammelkotprobe	205	47	147	11

Tab. 19: Kotprobenbefunde des 1. Untersuchungsdurchganges

4.2. Ergebnisse des zweiten, dritten und vierten

Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt

Hier wurden 975 Proben untersucht.

Alle 145 aus den Kulturversuchen gewonnenen Campylobacterisolate konnten auch mittels Direkter PCR bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Tab. 20 dargestellt.

Probenmaterial	Anzahl der untersuchten Proben	Anzahl der C.-positiven Proben	Anzahl der C.-negativen Proben
Sammelkotprobe	240	62	178
Schweinekot	56	46	10
Rinderkot	34	15	19
Legehennenkot	8	8	0
Hundekot	20	3	17
Katzenkot	14	1	13
Hunde- oder Katzenkot	1	0	1
Laufentenkot	1	1	0
Mäusekot	5	1	4
Pferdekot	3	0	3
Käfer	10	1	9
Fliegen	6	0	6
Maus tot	2	0	2
Wischtupfer Vorraum	148	7	141
Wischtupfer Lüftung	65	0	65
Wischtupfer Desinfektionswanne	53	0	53
Einstreu	105	0	105
Futter	117	0	117
Wasser	87	0	87
Total	975	145	830

Tab. 20: Campylobacter-Befunde des 2. – 4. Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt

4.3. Ergebnisse der biochemischen Differenzierung der Campylobacter-positiven Isolate des zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchganges

Eine Speziesdifferenzierung der 145 Campylobacter-Isolate aus den 2. – 4.

Untersuchungsdurchgängen erfolgte zunächst mit biochemischen Methoden (siehe 3.3.1.)

Die Ergebnisse der biochemischen Stammdifferenzierung sind in nachfolgenden Tabellen (Tab. 21, Tab. 22) dargestellt.

Ergebnis der biochemischen Untersuchung	Anzahl der C.-Isolate
C.jejuni	72
C.coli	64
Nicht thermophile Campylobacter	7
Fragliche Isolate	2
Total	145

Tab. 21: Ergebnisse der biochemischen Stammdifferenzierung des 2. – 4. Untersuchungsdurchganges

Probenmaterial	C.jejuni	C.coli	Nicht thermophile Campylobacter	Fragliche Isolate	Anzahl gesamt
Mastgeflügelkot	45	17	0	0	62
Schweinekot	2	42	2	0	46
Rinderkot	7	2	5	1	15
Legehennenkot	6	2	0	0	8
Hundekot	3	0	0	0	3
Katzenkot	0	0	0	1	1
Laufentenkot	1	0	0	0	1
Mäusekot	0	1	0	0	1
Käfer	1	0	0	0	1
Wischtupfer	6	1	0	0	7
Total	71	65	7	2	145

Tab. 22: Ergebnisse der biochemischen Stammdifferenzierung des 2.- 4. Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt

4.4. Ergebnisse der molekulargenetischen Differenzierung der Campylobacter-positiven Isolate des zweiten, dritten und vierten Untersuchungsdurchganges

Mit den unter 3.3.2. erwähnten Methoden erfolgte die molekulargenetische Differenzierung auf Speziesebene bei 145 Isolaten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 23, Tab. 24) dargestellt.

Ergebnis der PCR	Anzahl der C.-Isolate
C.jejuni	78
C.coli	58
Nicht thermophile Campylobacter	9
Total	145

Tab. 23: Ergebnisse der molekulargenetischen Stammdifferenzierung des 2. – 4. Untersuchungsdurchganges

Probenmaterial	C.jejuni	C.coli	Nicht thermophile Campylobacter	Anzahl gesamt
Mastgeflügelkot	49	13	0	62
Schweinekot	3	41	2	46
Rinderkot	7	2	6	15
Legehennenkot	6	2	0	8
Hundekot	3	0	0	3
Katzenkot	0	0	1	1
Laufentenkot	1	0	0	1
Maus	1	0	0	1
Käfer	1	0	0	1
Wischtupfer	7	0	0	7
Total	78	58	9	145

Tab. 24: Ergebnisse der molekulargenetischen Stammdifferenzierung des 2. – 4. Untersuchungsdurchganges nach Probenmaterial getrennt

Die biochemische Differenzierung von C. jejuni und C. coli beruht auf der Hippurathydrolyse. TOTTEN et al. (1987) beschrieben das Vorkommen von hippuratnegativen C. jejuni. Diese können nur mit molekulargenetischen Methoden, welche auf dem Hippuricasegen basieren, identifiziert werden.

In der biochemischen Differenzierung der 145 C.-Isolate konnten 64 der Spezies *C. coli* zugeordnet werden. Im Vergleich dazu wurden in der PCR nur 58 Isolate als *C. coli* identifiziert. Bei den übrigen 6 Stämmen konnte durch die PCR das Hippuricasegen nachgewiesen werden. Die Zuordnung dieser Fälle zur Spezies *C. jejuni* war somit möglich. 2 Stämme wiesen widersprüchliche biochemische Testergebnisse auf und konnten keiner Spezies zugeordnet werden. Die PCR erkannte diese als nicht-thermophile *Campylobacter*. Die Molekulargenetik bietet somit eine zuverlässige Spezies-Identifikation der Gattung *Campylobacter*.

4.5. Ergebnisse der Vidas-Analyse

Die Vidas-Analyse mit Anreicherung wurde dem Kulturverfahren gegenübergestellt (Tab. 25).

		Ergebnis der Kultur		Total
		negativ	positiv	
Vidas-Ergebnis	Negativ	91	14	105
	Positiv	2	33	35
	Total	93	47	140

Tab.25: Gegenüberstellung der Kultur- mit den Vidasergebnissen

Es ergibt sich eine Übereinstimmung in 88,6 % (124 von 140) der Fälle, mit 1,4 % (2) falsch-negativen und 10 % (14) falsch-positiven Ergebnissen.

Die Sensitivität betrug 70,2 %, d.h. 14 der 47 C.-positiven Proben wurden somit nicht erkannt.

Eine Spezifität betrug 97,8 % (91 von 93 Fällen).

4.6. In der Folge sollen verschiedene relevante Ergebnisse einer statistischen Analyse unterzogen werden

4.6.1. Zusammenhang zwischen der Betriebsgröße (Anzahl der Mastplätze) und dem Vorhandensein von C.-positiven Betrieben (%)

Die Betriebsgrößen (Anzahl der Mastplätze) wurden wie folgt in die Kategorien 1-6 unterteilt:

1..... bis 10 000	4.....30 001- 40 000
2.....10 001- 20 000	5.....40 001- 100 000
3.....20 001- 30 000	6.....über 100 000

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Betriebsgröße (Anzahl der Mastplätze) und dem Prozentsatz der Campylobacter-positiven Betriebe festgestellt werden (Abb. 3, Tab. 26).

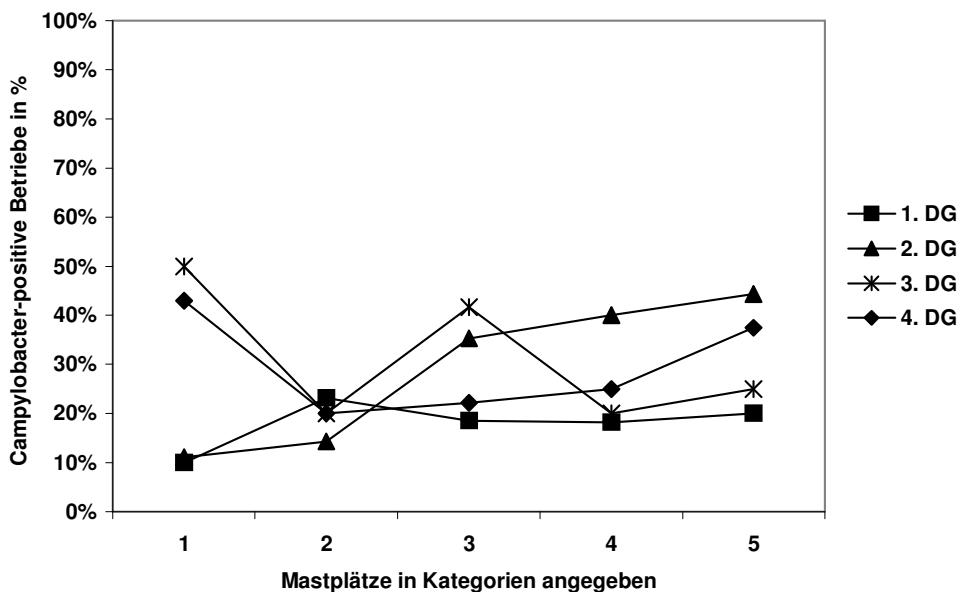


Abb. 3: Prozent der C.-positiven Betriebe bezogen auf die Anzahl der Mastplätze pro Betrieb und Durchgänge

Anzahl der Mastplätze	Campylobacter-positive Betriebe							
	1. Durchgang		2. Durchgang		3. Durchgang		4. Durchgang	
bis 10.000	2 von 20	10%	1 von 9	11%	4 von 8	50%	3 von 7	43%
10.001 - 20.000	6 von 26	23%	1 von 7	14%	1 von 5	20%	1 von 5	20%
20.001 - 30.000	5 von 27	19%	6 von 17	35%	5 von 12	42%	2 von 9	22%
30.001 - 40.000	2 von 11	18%	2 von 5	40%	1 von 5	20%	1 von 4	25%
40.000 - 100.000	3 von 15	20%	4 von 9	44%	2 von 8	25%	3 von 8	38%
über 100.000	1 von 1	100%	0 von 1	0%	1 von 1	100%	1 von 1	100%

Tab. 26: C.-positive Betriebe bezogen auf die Anzahl der Mastplätze pro Betrieb und Durchgänge

4.6.2. Einfluss von der Anzahl der Herden im Betrieb auf das Auftreten von Campylobacter

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Herden pro Betrieb und Häufigkeit des Auftretens von Campylobacter in diesen nachgewiesen werden.

Die Wahrscheinlichkeit eines Betriebes mit 4 Herden C.-positiv zu werden ist nicht grösser als mit 1 Herde (Abb. 4, Tab. 27).

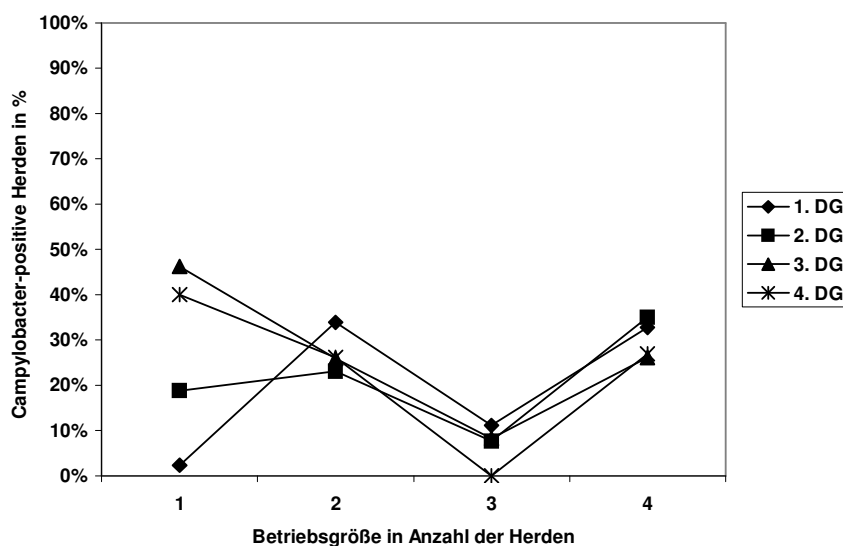


Abb. 4: Prozentsatz der C.-positiven Herden bezogen auf die Anzahl der Herden pro Betrieb nach Durchgängen getrennt

Betriebsgröße in Anzahl der Herden	Campylobacter-positive Herden							
	1. Durchgang		2. Durchgang		3. Durchgang		4. Durchgang	
1	1 von 44	2%	3 von 16	19%	6 von 13	46%	4 von 10	40%
2	21 von 62	34%	6 von 26	23%	7 von 27	26%	6 von 23	26%
3	3 von 27	11%	1 von 13	8%	1 von 12	8%	0 von 11	0%
4	19 von 58	33%	14 von 40	35%	6 von 23	26%	7 von 26	27%

Tab. 27: Anzahl der Herden in Relation zu den C.-positiven Befunden pro Durchgang

4.6.3. Stalleinheiten mit gemeinsamem Vorraum (in einem Gebäude) - der gleiche Campylobacter?

Betrachtet man Stalleinheiten, die zu zweit durch einen gemeinsamen Vorraum verbunden sind, so lassen sich die C.-Befunde der Herden in diesen zusammengehörigen Stalleinheiten wie folgt darstellen (Tab. 28).

Anzahl der Stalleinheiten mit gemeinsamem Vorraum		Campylobacter-positive Stalleinheiten			Gesamt n
		0 von 2	1 von 2	2 von 2	
2	Positiv:	0 von 2	1 von 2	2 von 2	58
	gefunden n	40	3	15	
	gefunden %	69%	5%	26%	
	erwartet n	34	21	3	
	erwartet %	58%	36%	6%	

Tab. 28: C.-Befunde der Herden und erwartete Häufigkeiten für 2 Stalleinheiten, die durch einen gemeinsamen Vorraum miteinander verbunden sind

Es wird deutlich sichtbar, dass 2 Stallungen mit einem gemeinsamen Vorraum häufiger positiv sind (26 %) als erwartet (6 %).

Ergebnisse von 3 und 4 Stalleinheiten, die in einen gemeinsamen Vorraum münden, liegen in einer zu geringen Anzahl vor (n = 3 bzw. n = 9 Betriebe), um ausgewertet zu werden.

4.6.4. Alter der Herde - Auftreten von Campylobacter

Grundsätzlich erfolgt die Infektion mit Campylobacter ab der 3. Lebenswoche (SMITHERMAN et al.,1984; HOOP u. EHRMANN, 1987).

In unserer Studie konnten auch wir deutlich zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiven C.-Nachweises grösser ist, je älter die Masthühner sind (Abb. 5, 6, Tab. 29, 30). Alle Herden eines Betriebes hatten dasselbe Alter.

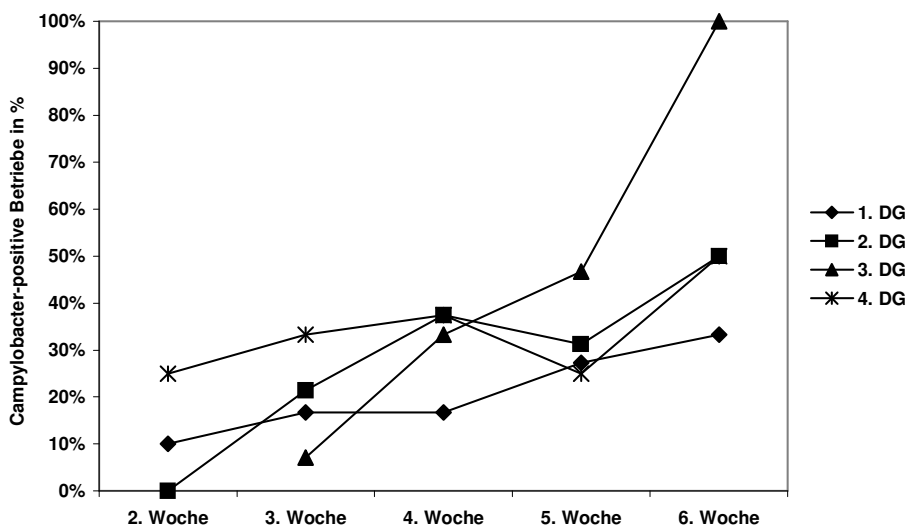


Abb. 5: Prozentsatz der C.-positiven Betriebe nach Alter und Durchgang getrennt

Campylobacter-positive Betriebe												
Alter in Wochen	1. Durchgang			2. Durchgang			3. Durchgang			4. Durchgang		
	pos	n	%	pos	n	%	pos	n	%	pos	n	%
1	0	2	0%									
2	1	10	10%	0	2	0%				1	4	25%
3	5	30	17%	3	14	21%	1	14	7%	2	6	33%
4	5	30	17%	3	8	38%	2	6	33%	3	8	38%
5	6	22	27%	5	16	31%	7	15	47%	3	12	25%
6	2	6	33%	3	6	50%	4	4	100%	2	4	50%
7				0	2	0%						

Tab. 29: Prozentsatz der C.-positiven Betriebe nach Alter und Durchgang getrennt

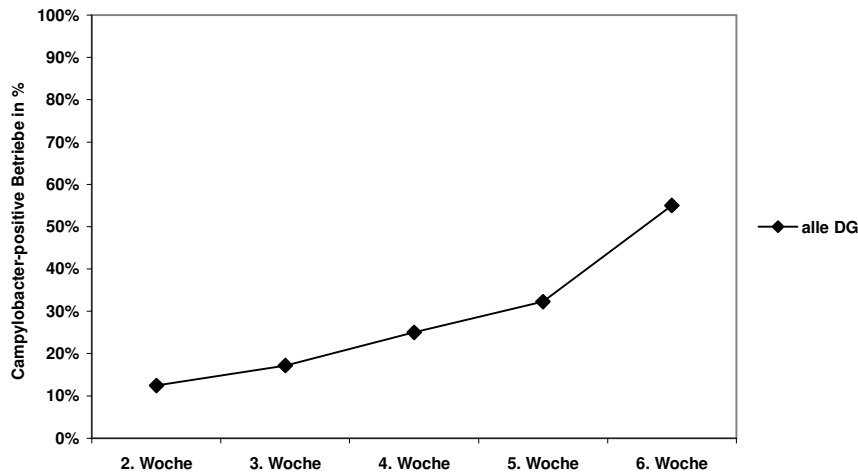


Abb. 6: Prozentsatz der C.-positiven Betriebe nach Alter und in allen Durchgängen zusammengefasst

Campylobacter-positive Betriebe				
Alter in Wochen	alle Durchgänge			
	pos		n	%
1	0	von	2	0%
2	2	von	16	13%
3	11	von	64	17%
4	13	von	52	25%
5	21	von	65	32%
6	11	von	20	55%
7	0	von	2	0%

Tab. 30: Prozentsatz der C.-positiven Betriebe nach Alter und in allen Durchgängen zusammengefasst

4.6.5. Alter des Stallgebäudes - Auftreten von Campylobacter

Wie in der Studie von BERNDTSON et al. (1996) konnten auch wir keinen Zusammenhang zwischen dem Alter des Gebäudes und dem Auftreten von Campylobacter nachweisen (P=0,492).

Eine Auswertung der Ergebnisse betreffend den Baujahren 1950 und 1960 waren aufgrund der wenigen Fälle nicht möglich.

In unserer Studie waren 54 Stallgebäude aus dem Baujahr 1970. Hiervon konnten in 11 Fällen Campylobacter gefunden werden. Für die Baujahre 1980 bzw. 1990 handelte es sich um insgesamt 30 bzw. 29 Stallgebäude, wovon in 6 bzw. 9 Fällen Campylobacter gefunden werden konnten (Tab. 31).

Baujahr		Campylobacter-Befund, 1. Durchgang		
		negativ	positiv	Gesamt
1960-1969	n	43	11	54
	%	80%	20%	100%
1970-1979	n	24	6	30
	%	80%	20%	100%
1980-1989	n	20	9	29
	%	69%	31%	100%
Gesamt	n	87	26	113
	%	77%	23%	100%

Tab. 31: Zusammenhang zwischen Jahr der Errichtung des Stallgebäudes und C.-positiven Befunden

EVANS u. SAYERS (2000) sahen ein Risiko in Bezug auf C.-Infektionen, wenn die Stallungen reparaturbedürftig waren.

In unserer Studie waren keine deutlich reparaturanfälligen Stallungen feststellbar.

4.6.6. Einstreumaterial (Stroh / Hobelspäne) - Auftreten von Campylobacter

In den von uns gezogenen 105 Einstreuproben (Stroh, Hobelscharten) konnten keine Campylobacter nachgewiesen werden.

Es konnte allerdings ein deutlicher Unterschied in der Häufigkeit der positiven Sammelkotbefunde im Vergleich von Stroh und Hobelspänen festgestellt werden. Bei Verwendung von Stroheinstreu waren mehr Betriebe C.-positiv. Dies konnte aber statistisch nicht abgesichert werden (Tab. 32).

Da Campylobacter sehr empfindlich gegenüber Trockenheit sind, besteht die Annahme, dass diese Bakterien im feuchten Milieu gut überleben können. Stroh ist u.U. weniger saugfähig und kann zu einer feuchten Plattenbildung führen. Allerdings waren auch alle untersuchten Strohsproben C.-negativ.

Nach den Ergebnissen von BERNDTSON et al. (1996) war eine grössere Infektionsrate mit Campylobacter bei Herden auf feuchter Einstreu nachzuweisen.

EINSTREU		Campylobacter-Befund, 1. Durchgang		
		negativ	positiv	Gesamt
Stroh	n	43	15	58
	%	74%	26%	100%
Hobelspäne	n	26	4	30
	%	87%	13%	100%
Stroh + Hobelspäne	n	12		12
	%	100%	0%	100%
Gesamt	n	81	19	100
	%	81%	19%	100%

Tab. 32: C.-Nachweis in Betrieben und verwendete Einstreumaterialien

4.6.7. Futter als Eintragsquelle für Campylobacter in den Bestand

Die Übertragung von Campylobacter mit dem Futter ist sehr unwahrscheinlich, selbst wenn eine Kontamination nach Hitzebehandlung und Pelletierungsvorgang erfolgen sollte (BERNDTSON et al., 1996). HUMPHREY et al. (1993) zeigten, dass die Überlebensdauer von Campylobacter im Futter bei 20 °C sehr gering ist.

Alle 117 gezogenen Futterproben, es handelte sich immer um industriell hergestelltes Futter, erwiesen sich als C.-negativ (Tab. 33).

Bei 93,2% der Betriebe ist ein geschlossenes Silosystem in Verwendung. Bei 6,8% der Fälle ist das System an einer oder mehreren Stellen ausserhalb der Stallungen offen zugänglich.

In 13,3% der Betriebe finden sich händisch zu befüllende Futtertröge, bei 86,7% automatische Rohr- und Kettenfütterungssysteme.

Probenmaterial	Untersuchte Proben	C.-negative Proben	C.-positive Proben
Futter	117	117	0

Tab. 33: Anzahl der untersuchten Futterproben und deren C.-Befund

4.6.8. Unterschiedlichen Wasserversorgung (öffentlich oder Hausbrunnen) - Auftreten von Campylobacter

Das Wasser aus Hausbrunnen wird immer wieder als mögliche Infektionsquelle von Campylobacter angegeben (KAPPERUD et al.,1993).

In den 87 gezogenen Wasserproben konnten keine Campylobacter nachgewiesen werden (Tab. 34).

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von JAKOBS-REITSMA et al.(1995) und BERNDTSON et al.(1996).

81 der 100 von uns untersuchten Betriebe verwenden Wasser aus Hausbrunnen, während nur 19 Betriebe aus öffentlichen Trinkwasserversorgungsanlagen beziehen.

Laut Geflügelhygiene Verordnung 2000 hat das Tränkwasser aus nicht öffentlicher Herkunft Trinkwasserqualität aufzuweisen. Dies ist jährlich zu überprüfen.

Wir konnten keinen signifikanten Unterschied im Auftreten von C. in Abhängigkeit von der Wasserversorgung feststellen (P=0,692).

Manche Studien beschreiben das Vorkommen von „viable but non culturable“ Formen im Wasser (OYOFO et al., 1992; PEARSON et al.,1993). Unsere Kulturmethode erlaubt allerdings nur eine Detektion von kulturfähigen Organismen.

Probenmaterial	Untersuchte Proben	C.-negative Proben	C.-positive Proben
Wasser	87	87	0

Tab. 34: Anzahl der untersuchten Wasserproben und deren C.-Befund

4.6.9. Tränksystem - Auftreten von Campylobacter

HUMPHREY et al. (1993) und KAPPERUD et al. (1993) konnten keinen Einfluss des Tränksystems auf ein vermehrtes Vorkommen von Campylobacter feststellen.

Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir 79 Betriebe mit Nippeltränken und 21 Betriebe mit Cups oder Rundtränken. Aufgrund der überwiegenden Anzahl von Betrieben, die mit Nippeltränken ausgestattet sind, lassen sich die erhobenen Daten statistisch nicht auswerten.

4.6.10. Vorkommen von Nagern (Mäuse) und Insekten (Käfer, Fliegen)

- Auftreten von Campylobacter

Nager und Insekten werden als mögliche Überträger von Campylobacter angesehen.

Häufig werden diese Tiere allerdings nicht in den Stallungen selbst angetroffen, sondern meist in den Vorräumen und der Umgebung (GREGORY et al,1997).

BERNDTSON et al. (1996) konnten einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Mäusen und Campylobacter-positiven Herden aufzeigen.

Die Anwesenheit von toten Mäusen in den Vorräumen wurde nur in 2 Fällen nachgewiesen.

Lebende Mäuse konnten weder in den Vorräumen noch in den Stallungen angetroffen werden.

In 5 Betrieben konnte Mäusekot in den Vorräumen gefunden werden. In einem dieser fünf untersuchten Fälle Campylobacter nachgewiesen. Hierbei handelte es sich um *C. jejuni*, welcher auch im Mastgeflügel des Betriebes zu finden war.

69 der 77 befragten Betriebsbesitzer gaben an, Schadnager aktiv zu bekämpfen. In den meisten Fällen werden zur Tilgung von Nagern in den Betrieben Köder oder Rodentizide ausgelegt.

Die Haltung von Katzen am Betrieb wurde von den Landwirten oft als ausreichende Bekämpfungsmassnahme bezeichnet.

Fliegen waren in der Regel nur in der Stallumgebung, in Vorräumen und in Schweine- und Rinderstallungen zu finden. In Hühnerstallungen konnten sie bei keinem Untersuchungsdurchgang gefunden werden. 97,3% der Landwirte gaben an, dass Fliegen nicht aktiv am Betrieb bekämpft werden. Fliegengitter waren in keinem Stallgebäude oder Vorraum vorhanden.

Besondere Vorbeugungs- oder Bekämpfungsmassnahmen gegen den Käferbefall gab es, abgesehen von der routinemässigen Reinigung nach der Ausstallung, in den Betrieben nicht.

ALTEKRUSE et al. (1994) und JAKOBS-REITSMA et al. (1995) bestätigten die Annahme, dass Hausfliegen und Käfer als Vektoren für *C. jejuni* fungieren.

Wir konnten nur in vereinzelt Fällen Hausfliegen und Käfer vorfinden, welche sich allerdings, mit Ausnahme einer Käferprobe, als *C.*-negativ erwiesen.

Die zu geringe Anzahl gefundener Nager und Insekten lassen allerdings keine statistische Auswertung zu (Tab. 35). Trotzdem sollten Nager und Insekten keinesfalls als mögliches Reservoir für Campylobacter ausser acht gelassen werden.

Probenmaterial	Untersuchte Proben	C.-negative Proben	C.-positive Proben
Käfer	10	9	1
Mäusekot	5	4	1
Fliegen	6	6	0
Gesamt	21	19	2

Tab. 35: Anzahl der untersuchten Insekten- und Nagerproben und deren C.-Befund

4.6.11. Hygienemaßnahmen (Mantel, Desinfektionswanne, Schuhe)

- Auftreten von Campylobacter

HOOP u. EHRSAM (1987) kamen zum Schluss, dass Campylobacter über Eintragsquellen aus der unmittelbaren Umgebung der Stallungen in eine Mastgeflügelherde gelangen. Diese Ansicht wurde auch von KAZWALA et al. (1990) bestätigt, die Campylobacter von den Schuhen und aus Wasserpfützen nahe den Stallungen isolieren konnten. Eine Verteilung des Erregers erfolgt mit dem Personal, das sich zwischen den Stallungen bzw. zwischen den Betrieben bewegt (HUMPHREY et al., 1993).

GREGORY et al. (1997) kamen zum Schluss, dass die Verwendung von Einmal-Plastiküberschuhen eine sinnvolle Maßnahme zur Prevention von Campylobacter-Infektionen darstellt.

75 Betriebe wurden auf das Vorhandensein von stalleigenen Mänteln, Schuhen und Desinfektionswannen überprüft und die Ergebnisse in Bezug zu den C.-Befunden dieser Betriebe (zumindest 1 Herde C.-positiv) gesetzt (Tab. 36).

Hygiene- maßnahmen		Campylobacter-Befund, 1. Durchgang		
		negativ	positiv	Gesamt
MANTEL	n	8	2	10
nicht vorhanden	%	80%	20%	100%
MANTEL	n	52	13	65
vorhanden	%	80%	20%	100%
SCHUHE	n	5	1	6
nicht vorhanden	%	83%	17%	100%
SCHUHE	n	55	14	69
vorhanden	%	80%	20%	100%
WANNE	n	24	6	30
nicht vorhanden	%	80%	20%	100%
WANNE	n	36	9	45
vorhanden	%	80%	20%	100%
Gesamt	n	60	15	75
	%	80%	20%	100%

Tab. 36: C.-Befunde in Abhängigkeit vom Vorhandensein betriebseigener Mäntel, Schuhe und Desinfektionswannen laut Fragebogen

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde das Vorhandensein und der Füllungszustand (gefüllt = benutzt) sowie eine kontinuierliche Benutzung der Desinfektionswannen eingehender betrachtet.

Im 2. Untersuchungsdurchgang wurden 91 Herden untersucht, vor den Stallungen von 60 Herden waren Desinfektionswannen vorhanden, allerdings waren nur 21 mit Desinfektionsmittel gefüllt.

Im 3. Untersuchungsdurchgang hatten 51 von 74 Herden eine Desinfektionswanne, wovon 17 mit Desinfektionsmittel gefüllt waren. Der 4. Untersuchungsdurchgang umfasste 70 Herden, wovon 51 eine Desinfektionswanne hatten, 30 davon waren gefüllt (Tab. 37).

Durchgang		Wanne nicht vorhanden	Wanne nicht gefüllt	Wanne gefüllt	Gesamt
2	n %	31 34%	39 43%	21 23%	91 100%
3	n %	23 31%	34 46%	17 23%	74 100%
4	n %	19 27%	21 30%	30 43%	70 100%

Tab. 37: Vorhandensein und Füllung (d.h. „benutzt“) von Desinfektionswannen bezogen auf Herden je Untersuchungsdurchgang

In nur 8 Herden waren die Desinfektionswannen in allen 3 Untersuchungsdurchgängen zum Zeitpunkt der Überprüfung gefüllt.

Bei 12 Herden waren die Wannen in 2 von 3 Untersuchungsdurchgängen in Benutzung.

Bei 20 Herden wurden die Desinfektionswannen nur in einem Untersuchungsdurchgang benutzt.

Bei 58 Herden waren Desinfektionswannen vorhanden, sie wurden allerdings nicht gefüllt (Tab. 38).

WANNE	2. Durchgang	3. Durchgang	4. Durchgang	Anzahl
nicht vorhanden				62
vorhanden	gefüllt	gefüllt	gefüllt	8
vorhanden	gefüllt	gefüllt	nicht gefüllt	4
vorhanden	gefüllt	nicht gefüllt	gefüllt	3
vorhanden	nicht gefüllt	gefüllt	gefüllt	5
vorhanden	gefüllt	nicht gefüllt	nicht gefüllt	6
vorhanden	nicht gefüllt	nicht gefüllt	gefüllt	14
vorhanden	nicht gefüllt	nicht gefüllt	nicht gefüllt	58

Tab. 38: Vorhandensein und kontinuierliche Benutzung der Desinfektionswannen, auf die Herden bezogen und nach Durchgängen getrennt

Weiters versuchten wir, einen etwaigen Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere (je Durchgang) und der Füllung (Verwendung) einer Desinfektionswanne aufzuzeigen. Es konnte deutlich gesehen werden, dass bei Herden in den ersten 3 Lebenswochen Desinfektionswannen in 55 % - 75 % der Fälle benutzt werden. Danach sinkt der Prozentsatz kontinuierlich. Diese Tendenz lässt sich in allen drei Durchgängen bestätigen (Tab. 39, Abb. 7).

Alter	2. Durchgang			3. Durchgang			4. Durchgang			
		Wanne nicht gefüllt	Wanne gefüllt	Gesamt	Wanne nicht gefüllt	Wanne gefüllt	Gesamt	Wanne nicht gefüllt	Wanne gefüllt	Gesamt
2. Woche	n	1	0	1				4	4	8
	%	100%	0%	100%				50%	50%	100%
3. Woche	n	12	9	21	9	9	18	1	12	13
	%	57%	43%	100%	50%	50%	100%	8%	92%	100%
4. Woche	n	11	4	15	5	6	11	8	7	15
	%	73%	27%	100%	45%	55%	100%	53%	47%	100%
5. Woche	n	11	6	17	15	2	17	5	6	11
	%	65%	35%	100%	88%	12%	100%	45%	55%	100%
6. Woche	n	4	2	6	5	0	5	3	1	4
	%	67%	33%	100%	100%	0%	100%	75%	25%	100%
Gesamt	n	39	21	60	34	17	51	21	30	51
	%	65%	35%	100%	67%	33%	100%	41%	59%	100%

Tab. 39: Prozentsatz der gefüllten Desinfektionswannen im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere (je Durchgang) in absoluten Zahlen

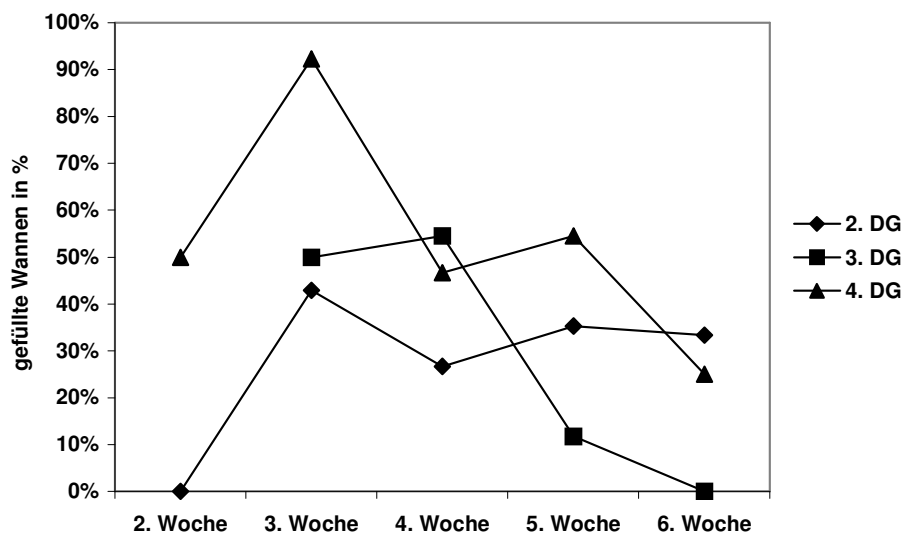


Abb.7: Anteil der gefüllten Desinfektionswannen (in Prozent) je Durchgang im Zusammenhang mit dem Alter der Tiere

Wanne	Campylobacter-Befund, alle Durchgänge			
		negativ	positiv	Gesamt
nicht gefüllt	n	76	18	94
	%	81%	19%	100%
gefüllt	n	49	19	68
	%	72%	28%	100%
Gesamt	n	125	37	162
	%	77%	23%	100%

Tab. 40: Zusammenhang zwischen Füllung der Desinfektionswannen und C.-positiven Herden, alle Durchgänge zusammengefasst

Die Reinigung und Desinfektion der Betriebsräumlichkeiten und Stallungen sind in der Geflügelhygieneverordnung 2000 gesetzlich vorgeschrieben. Nach einer entsprechenden Grob- und Nassreinigung müssen die Stallungen auch desinfiziert werden. Üblicherweise werden hierzu Hochdruckreiniger verwendet. Eine Leerstehzeit von mindestens 7 Tagen ist einzuhalten.

Die Liste der in den Betrieben verwendeten Desinfektionsmittel ist umfangreich. Der Einsatz bestimmter Mittel wird einerseits vom betreuenden Tierarzt und andererseits von den Integrationen, für welche die Betriebe produzieren, beeinflusst.

Am gebräuchlichsten sind die Formalinbegasung sowie der Einsatz von Mitteln basierend auf Aldehyden oder Organischen Säuren.

4.6.12. Anwesenheit von anderen Tieren am Betrieb

- Auftreten von Campylobacter

Die Anwesenheit von Nutztieren (Schweine, Rinder, Legehennen, Puten) und Haustieren (Hund, Katze) am Betrieb wurde in dieser Studie registriert, da diese Tiere in der Literatur immer wieder als mögliche Reservoirs von C. angeführt werden (GREGORY et al., 1997; JAKOBS-REITSMA et al., 1995; KAPPERUD et al., 1993).

An 75,6 % der Betriebe wird neben dem Mastgeflügel mindestens eine Nutztierart gehalten.

Schweine:

Von 77 mittels Fragebogen untersuchten Geflügelmastbetrieben hielten 49 Schweine. In den Durchgängen 2-4 wurden 79 Schweinekotproben untersucht. In 30 Fällen (n=79) konnte ein C.-positiver Befund des Mastgeflügels erhoben werden (Tab 43).

Aufgrund statistischer Berechnungen war ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Schweinen und einem C.-positiven Befund der Mastgeflügelherde festzustellen (P=0,007) (Tab. 41).

Schweine am Betrieb	Campylobacter-Befund, 1. Durchgang			
		negativ	positiv	Gesamt
nicht vorhanden	n	27	1	28
	%	96%	4%	100%
vorhanden	n	34	15	49
	%	69%	31%	100%
Gesamt	n	61	16	77
	%	79%	21%	100%

Tab. 41: Anwesenheit von Schweinen am Betrieb bezogen auf den C.-Befund der Mastgeflügelherden laut Fragebogen

Mittels molekulargenetischen Methoden wurden die C.-Isolate aus Sammelkotproben differenziert, wobei kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit einer bestimmten C.-Spezies im Mastgeflügelkot und der Anwesenheit von Schweinen am Betrieb nachgewiesen werden konnte (Tab. 42).

C.jejuni konnte in 6,5 % (3) der Isolate (n=46) aus Schweinekotproben nachgewiesen werden. Die Mastgeflügelherden hatten zu 79 % (49) C. jejuni (n=62).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Studie von JACOBS-REITSMA et al. (1995).

Aus vorangegangene Studien ist eine Dominanz von C. coli in Schweinen bekannt.

GREGORY et al. (1997) vermuteten, dass Campylobacter aus Schweinen nur erschwert den Geflügeldarm besiedeln können.

Schweine am Betrieb	Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 2. Durchgang					Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	15	2	0	0	17
	%	88%	12%	0%	0%	100%
vorhanden	n	19	8	2	1	30
	%	63%	27%	7%	3%	100%
Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 3. Durchgang						Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	9	1	3	0	13
	%	69%	8%	23%	0%	100%
vorhanden	n	16	7	3	0	26
	%	62%	27%	12%	0%	100%
Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 4. Durchgang						Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	9	2	0	0	11
	%	82%	18%	0%	0%	100%
vorhanden	n	14	6	2	1	23
	%	61%	26%	9%	4%	100%

Tab. 42: Vergleich der Anwesenheit von Schweinen am Betrieb mit dem PCR-Ergebnissen des Mastgeflügelkots (2., 3., 4. Durchgang)

Rinder:

Von 77 mittels Fragebogen untersuchten Geflügelmastbetrieben hielten 31 Rinder.

In den Durchgängen 2-4 wurden 43 Rinderkotproben untersucht. In 12 Fällen (n=43) konnte ein C.-positiver Befund des Mastgeflügels erhoben werden (Tab 43).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen vermehrten Auftreten von Campylobacter und gemeinsamer Haltung von Rindern und Mastgeflügel am selben Betrieb gefunden werden.

Rinder am Betrieb	Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 2. Durchgang					Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	21	6	2	1	30
	%	70%	20%	7%	3%	100%
vorhanden	n	13	5	0	0	18
	%	72%	28%	0%	0%	100%
Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 3. Durchgang						Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	16	6	4	0	26
	%	62%	23%	15%	0%	100%
vorhanden	n	9	2	2	0	13
	%	69%	15%	15%	0%	100%
Campylobacter-Befund des Mastgeflügels, 4. Durchgang						Gesamt
		negativ	C. jejuni	C. coli	C.jejuni u. coli	
nicht vorhanden	n	14	5	2	1	22
	%	64%	23%	9%	5%	100%
vorhanden	n	9	3	0	0	12
	%	75%	25%	0%	0%	100%

Tab. 43: Vergleich der Anwesenheit von Rindern am Betrieb mit dem PCR-Ergebnissen des Mastgeflügelkots

15 Rinderkotproben wurden untersucht.

Nach Speziesdifferenzierung (PCR) stellten wir fest, dass 46 % (7) der Isolate (n= 15) aus Rinderkot *C. jejuni* waren. Allerdings fanden sich nur in 2 Fällen auch in der gleichzeitig gehaltenen Mastgeflügelherde *C. jejuni*.

Bei 40 % (6) der Isolate aus Rinderkot handelte es sich um nicht-thermophile *Campylobacter*. Diese konnten in den Geflügelkotproben nicht nachgewiesen werden.

Hier ist allerdings anzumerken, dass die Isolierungen ausschliesslich bei 42°C erfolgten. Bei dieser Temperatur könnten nicht alle nicht-thermophilen *C.* kultiviert worden sein.

Legehennen:

7 (77) Betriebe hielten Legehennen.

Die geringe Anzahl an Fällen lässt eine statistische Auswertung nicht zu.

Alle untersuchten Legehennen konnten jedoch als permanente Ausscheider von *Campylobacter* identifiziert werden. 75 % hiervon war *C.jejuni*, 25 % *C. coli*.

Hunde und Katzen:

Hunde wurden in 43, Katzen in 56 von 77 Mastgeflügelbetrieben gehalten.

Eine Untersuchung erfolgte bei 20 Hunden und 14 Katzen.

15 % der Hunde und 7 % der Katzen waren *C.*-positiv.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Campylobacter* und der Anwesenheit von Hunden und Katzen konnte nicht festgestellt werden.

4.6.13. Kontinuität der Campylobacter-Befunde (pos. / neg.) auf Betriebsebene

Weiters sollten Hinweise über Zunahme bzw. Abnahme der C.-positiven Befunde sowie über die Kontinuität der C.-Befunde in den Betriebe überprüft werden. Dies erfolgte durch Vergleich der einzelnen Durchgänge miteinander, wobei nur die mehrfach untersuchten Betriebe beurteilt werden konnten.

Der Vollständigkeit halber sei festgehalten, dass in Betrieben mit mehreren Stallungen (Herden), diese nicht immer in allen Durchgängen besetzt waren.

Vergleicht man den 1. und 2. Untersuchungsdurchgang, so blieben 30 von 48 Betrieben in ihrem C.-Befund konstant. Bei 18 Betrieben wechselte der Befund: 10 Betriebe von C.-negativ zu positiv, 8 Betriebe von C.-positiv zu C.-negativ. Es kam zu keiner Änderung der Häufigkeit der positiven Befunde über die Zeit ($P=0,815$), aber viele Betriebe änderten ihren C.-Status über die Zeit ($Kappa=0,053$) (Tab.44).

Beim Vergleich des 2. mit dem 3. Untersuchungsdurchgang ergibt sich ein ähnliches Bild. 23 von 38 Betrieben änderten ihren C.-Befund nicht. 15 Betriebe wechselten den Befund folgendermassen: 8 Betriebe von C.-negativ zu C.-positiv und 7 Betriebe von C.-positiv zu C.-negativ ($P=1,000$; $Kappa=0,107$).

Von den 32, im 3. und 4. Durchgang untersuchten Betrieben wurden folgende Daten erhoben: 23 Betriebsergebnisse blieben gleich. 9 wechselten den Befund: 4 Betriebe wechselten von C.-negativ zu C.-positiv, 5 von C.-positiv zu C.-negativ ($P=1,000$; $Kappa=0,390$).

Unsere Studie zeigte, dass 42 Betriebe ihren C.-Status über die Zeit änderten.

1. Durchgang		2. Durchgang		Gesamt
		negativ	positiv	
negativ	n	26	10	36
	%	54%	21%	75%
positiv	n	8	4	12
	%	17%	8%	25%
Gesamt	n	34	14	48
	%	71%	29%	100%

Tab. 44: Kontinuität der C.-Befunde auf Betriebsebene (1. / 2. Untersuchungsdurchgang)

9 von 31 Betrieben, die 4 mal untersucht worden sind, blieben während der gesamten Studie C.-negativ. Bei genauer Durchsicht der Bedingungen in diesen Betrieben war eine offensichtliche Erklärung dafür nicht festzustellen. Die hygienischen Voraussetzungen entsprachen dem Durchschnitt der übrigen Betriebe, es befanden sich auch andere Tiere in den Betrieben. Weiters ist aufgefallen, dass C.-positive und C.-negative Herden gleichzeitig im selben Betrieb vorkamen. Diese Beobachtungen finden sich auch bei JAKOB-REITSMA et al. (1995). Die Autoren stellten eine ständig stattfindende horizontale Infektion der Herden fest. Sowohl C.-positive als auch C.-negative Herden waren im selben Betrieb zu finden.

Daraus kamen die Autoren zu dem Schluss, dass C.-freie Aufzucht möglich sein sollte.

4.6.14. Hat die Jahreszeit einen Einfluss auf das Auftreten von Campylobacter ?

Eine Infektion mit Campylobacter wird in der Literatur häufig in Zusammenhang mit der Jahreszeit gebracht. Zahlreiche Autoren konnten eine erhöhte Infektionsrate im Zeitraum Mai bis Oktober feststellen (KAPPERUD et al., 1993; JAKOBS-REITSMA et al., 1994; STERN, 1995; WILLIS u. MURRAY, 1997).

Unsere Ergebnisse decken sich mit jenen von GREGORY et al. (1997) und HUMPHREY et al. (1993), welche keinen saisonalen Unterschied in der Infektionsrate erkennen (Tab. 46).

Folgende Zeiträume wurden als Jahreszeiten festgelegt (Tab. 45).

Durchgang	besuchte Betriebe	Untersuchungszeitraum	
		von	bis
1	100	24.07.1998	30.07.1999
2	48	10.02.2000	04.07.2000
3	39	27.07.2000	07.10.2000
4	34	07.09.2000	24.01.2001

Tab. 45: Untersuchungszeiträume nach Durchgängen getrennt

Durchgang	Campylobacter-Befund			Gesamt
		negativ	positiv	
1	n	81	19	100
	%	81%	19%	100%
2	n	34	14	48
	%	71%	29%	100%
3	n	25	14	39
	%	64%	36%	100%
4	n	23	11	34
	%	68%	32%	100%

Tab. 46: Campylobacter-Befunde der Betriebe nach Durchgängen getrennt

5. Schlussfolgerungen , Massnahmen

Ein erhöhtes Infektionsrisiko ergibt sich aufgrund von Literaturangaben aus mehreren Faktoren:

- Schlechte Grobreinigung und Desinfektion der Stallungen
- Mangelnde Säuberung von Stallumgebung (oder Hof etc.)
- Schlechter Zustand des Stalles, Teile des Stalles sollten repariert werden
- Keine eigenen Schuhe, Mäntel für jeden Stall
- Keine Desinfektionswanne vor jedem Stall. Die Desinfektionswanne ist nicht mit Desinfektionsmittel beschickt. Wird die Desinfektionswanne befüllt, ist das Desinfektionsmittel möglicherweise nicht in der richtigen Konzentration angewendet worden.
- Gemeinsamer Vorraum für mehrere Stallungen ohne Hygienebarrieren
- Wasserversorgung hat nicht Trinkwasserqualität
- Einstreu ist potentielle Quelle einer Infektion, wenn sie feucht gelagert wird
- Andere Tiere im Stall/Betrieb: Schweine, Rinder, Hunde, Katzen.
Legehennen sind fast immer C.-positiv
Mäuse, Ratten, Insekten als Infektionsquelle
- Kadaversammelstelle in der Nähe des Stalles

Erhöhtes Infektionsrisiko, bzw. Eintragsquellen, die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesen werden konnten:

- Bei Nassreinigung der Stallungen wird Material aus dem Stall häufig einfach in die Stallumgebung geschwemmt, dort erfolgt oft keine Reinigung.
- Die Desinfektionswannen vor den Stallungen fehlen manchmal, oft sind sie nicht mit Desinfektionsmittel gefüllt und/oder hochgradig verschmutzt. Möglicherweise stimmt die Konzentration des Desinfektionsmittels in den Desinfektionswannen nicht, dies wurde in

den vorliegenden Untersuchungen nicht kontrolliert. Aufgrund unserer Daten scheint die Benutzung der Desinfektionswannen mit zunehmenden Alter der Tiere abzunehmen.

- Es werden nicht immer eigene Mäntel und Schuhe für die einzelnen Stallungen (Herden) verwendet.
- Die Stallungen sollten am besten mit Einmal-Plastiküberschuhen betreten werden, da die Übertragung von C. über den Kot auf den Schuhen sehr leicht stattfindet und das Eintauchen der Schuhe in Desinfektionsmittel dann ohne Wirkung bleibt, wenn sich größere Kotmengen auf den Schuhsohlen befinden. Diese sind dann nicht genügend mit Desinfektionsmittel durchtränkt. Eventuell könnten die Schuhe auch direkt in den Desinfektionswannen abgestellt werden.
- Bei mehreren Stallungen (Herden), die durch einen gemeinsamen Vorraum verbunden sind, besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko.
- Die Hände sollten immer wieder gewaschen und desinfiziert werden.
- Legehennen im selben Betrieb stellen immer ein erhöhtes Infektionsrisiko dar, da diese Herden fast immer C.-positiv sind.
- Andere Hühnerherden im Betrieb: je älter die Hühner sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie C.-positiv sind.
- Wenn auch in dieser Studie die Übertragung des Erregers von Schweinen, Rindern, Hunden und Katzen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, sind solche Tiere im Betrieb ein potentiell Infektionsrisiko. Daher müssen Desinfektionswannen vor Rinder- und Schweineställen aufgestellt werden. Hunde und Katzen dürfen nicht in die Vorräume und den Hühnerstall, aber auch nicht in die Lagerstätte von Einstreumaterial.
- Erhöhtes Infektionsrisiko durch Personal und wieder verwendete Geräte bei fraktionierter Schlachtung.

Die verbleibende Herde ist möglicherweise auch durch den Stress aufgrund des Herausfangens der Tiere geschwächt.

- Eigenes Werkzeug (Besen, etc.) für jede Herde ist zu empfehlen.
- Nagetier- und vogelsichere Abschirmung der offenen Silosysteme
- Betreten des Stalles soll Betriebsfremden untersagt werden.
- Personen- und Tierverkehr zwischen den Betrieben sollte bei den hygienischen Überlegungen Beachtung finden. Ebenso die eventuell notwendige Reinigung von Fahrzeugen.
- Die verwendete Gerätschaft (Scheibtruhen, Traktore, Schaufeln etc.) müssen regelmässig gereinigt und desinfiziert werden.

Da die C.-Infektion in den Betrieben derzeit nicht verhindert und durch Therapie auch nicht zielführend bekämpft werden kann, kommt den Hygienemaßnahmen eine enorme Bedeutung zu. Die Infektion erfolgt horizontal aus der Stallumgebung oder über andere Tiere, die sich im Betrieb befinden. Nur eine konzertante Aktion verschiedener hygienischer Maßnahmen ist wirklich zielführend.

6. Zusammenfassung

Mastgeflügel ist häufig Träger der thermophilen *Campylobacter* (C.), *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*. Die Erreger befinden sich in der Schleimhaut des Darms, meist ohne pathologische Veränderungen des Gewebes beim Geflügel zu verursachen. Eine Kontamination der Schlachtkörper kann während des Schlachtvorganges erfolgen.

Häufige Infektionsquellen für den Menschen sind unzureichend erhitztes Geflügelfleisch und andere mit C.-kontaminierte Lebensmittel.

Diese Studie hat zum Ziel, mögliche Eintragsquellen von *Campylobacter* in Mastgeflügelbestände aufzuzeigen.

Die Studie gliedert sich in vier Untersuchungsreihen. Zunächst wurde der C.-Status von 100 Mastgeflügelbetrieben erhoben. Mit einem Fragebogen wurden betriebs-, stall- und herdenspezifische Daten erfasst.

Basierend auf den gewonnenen Daten wurde eine reduzierte Anzahl an Betrieben ausgewählt, deren Mastgeflügelherden einschliesslich möglicher Eintragsquellen in der 2., 3. und 4. Untersuchungsreihe überprüft wurden. Zur Feststellung potentieller Eintragsquellen wurden Wasser-, Futter-, Einstreuproben, Kotproben von am Betrieb gehaltenen Nutz- und Haustieren sowie Nagetiere, Insekten und Wischtupfer untersucht. Um epidemiologische Fragestellungen zu beantworten, wurden 145 C.-Isolate sowohl einer biochemischen als auch einer molekulargenetischen Differenzierung auf Speziesebene unterzogen.

In der 1. Untersuchungsreihe konnten C. aus 22,9 % der 205 Herden aus 100 Betrieben isoliert werden. In der 2., 3. und 4. Untersuchungsreihe wurden in 48 mehrfach untersuchten Betrieben 240 Herden untersucht.

Die C.-Befunde variierten von Herde zu Herde.

Nur 9 Betriebe blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes stets C.-negativ. Häufig gelang die Aufzucht einer C.-negativen Herde im Anschluß an eine C.-positive Herde, was den Schluss zulässt, dass eine gründliche Reinigung und Desinfektion eine unerlässliche Massnahme in der C.-Prevention ist.

Über das Jahr verteilt konnte kein saisonal vermehrtes Auftreten festgestellt werden.

Gemeinsame Vorräume von Stallungen, die Anwesenheit von anderen Tieren am Betrieb sowie mangelnde Hygiene konnten als Risikofaktoren für das Auftreten von C. festgestellt werden. Alle Wasser-, Futter- und Einstreuproben erwiesen sich als C.-negativ.

7. Literaturverzeichnis

- 1.) Altekruze, S.F., Hunt, J.M., Tollefson, L.K., Madden, J.M. (1994):
Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection.
JAVMA **204**, 57-60.
- 2.) Atabay, H.I., Corry, J.E.L. (1998):
The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods.
J. Appl. Microbiol. **84**, 733-740.
- 3.) Atabay, H.I., Corry, J.E.L., On, S.L.W. (1998a):
Diversity and Prevalence of *Arcobacter* spp. in broiler chickens.
J. Appl. Microbiol. **84**, 1007-1016.
- 4.) Atabay, H.I., Corry, J.E.L., On, S.L.W. (1998b):
Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*.
J. Appl. Microbiol. **84**, 1017-1024.
- 5.) Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S., Nevell, D.G. (1996):
Restriction Fragment Length Polymorphism of Polymerase Chain Reaction Products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations.
Res.Vet. Sci. **60**, 168-172.
- 6.) Baenffer, J.R.J (1985):
Biotypes and Serotypes of *C. jejuni* and *C. coli* strains isolated from patients, pigs and chickens in the region of Rotterdam.
J. Infect. **10**, 277-281.
- 7.) Balucinska, B., Vasicek, L., Breuer-Strosberg, R., Awad-Masalmeh, M. (1997):
Zum Vorkommen von *Campylobacter* beim Hund.
Wien. Tierärztl. Mschr. **84**, 322-324.
- 8.) Barrett, T.J., Patton, C.N., Morris, G.K. (1988):
Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization.
Lab. Med. **19**, 96-102.
- 9.) Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966):
Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method.
Am. J. Clin. Path. **45**, 493-496.
- 10.) Beuchat, L.R. (1986):
Methods for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.
Poultry Science **65**, 2192-2198.
- 11.) Berndtson, E., U. Emanuelson, A. Engvall, M.-L. Danielsson-Tham (1996):
Campylobacter incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the Slaughter process.
Int. J. Food Microbiol. **32**, 35-47.

- 12.) Boom, R., Sol., C.J.A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Noorda, van der, J. (1990):
Rapid and simple method for purification of nucleic acids.
J. Clin. Microbiol. **28**, 495-503.
- 13.) Chattopadhyay, U.K., Rathore, R.S., Das, M.S., Pal, D., Dey, N.K. (1991):
Poultry as a reservoir and source of human Campylobacteriosis.
Indian Vet. J. **68**, 911-914.
- 14.) Corbeil, L.B., Schurig, G.D., Bier, P.J., Winter, A.J. (1975):
Bovine veronal vibriosis: Antigenic variation of the bacterium during infection.
Infect. Immun. **11**, 240-244.
- 15.) Corry, J.E.T., Post, D.E., Colin, P., Laisney, M.J. (1995):
Culture media for the isolation of campylobacters.
Int. J. Food Microbiology **26**, 43-76.
- 16.) Evans, S.J, Sayers, A. R. (2000):
A longitudinal study of Campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain.
Preventive Vet. Med. **46**, 209-223.
- 17.) Food and Drug Administration (1998):
Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. (Revision A), AOAC International.
- 18.) Fermer, C., Engvall, E.O. (1999):
Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*.
J. Clin. Microbiol. **37**, 3370-3373.
- 19.) Gebhart, C.J., Edmonds, Ward, G.E., Kurtz, H.J., Brenner, D.J. (1985):
„Campylobacter hyointestinalis“ sp. nov.: a new species of Campylobacter found in the intestines of pigs and other animals.
J. Clin. Microbiol. **21**, 715-720.
- 20.) Glünder, G., Petermann, S. (1989):
Vorkommen und Charakterisierung von Campylobacter spp. bei Silbermöwen (*Larus argentatus*), Dreizehenmöwe (*Rissa tridactyla*) und Haussperlingen (*Passer domesticus*).
J. Vet. Med. **36**, 123-130.
- 21.) Gregory, E., Barnhart, H., Dressen, D.W., Stern, N.J., Corn, J.L. (1997):
Epidemiological Study of Campylobacter spp. in Broilers: Source, Time of Colonization, and Prevalence.
Avian Diseases **41**, 890-898.
- 22.) Griffiths, P.L., Park, R.W.A. (1990):
Campylobacters associated with human diarrhoeal disease.
J. Appl. Bacteriol. **69**, 281-301.

- 23.) Hald, B., Wedderkopp, A., Madsen, M. (2000):
Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks. *Avian Path.* **29**, 123-131.
- 24.) Hani, E.K., Chan, V.L. (1995):
Expression and Characteriation of *Camp. jejuni* benzoylcine amidohydrolyase (hippuricase) gene in *E.coli*.
J. Bacteriol. **177**, 2396-2402.
- 25.) Harris, N.V., Weiss, N.S., Nolan, C.N. (1986):
The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni* / *coli* enteritis. *Am. J. Publ. Health* **76**, 407-411.
- 26.) Harris, N.V., Kimball, T.J., Bennett, P., Johnson, Y., Wakely, D., Nolan, C.N. (1987):
Campylobacter jejuni enteritis associated with raw goat's milk.
Am. J. Epidemiol. **126**, 179.186.
- 27.) Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.**

(1994):

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9.ed., Williams & Wilkins, Baltimore.

- 28.) Hoop R., Ehram, H. (1987):
Ein Beitrag zur Epidemiology von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in der Hühnermast.
Schweiz. Arch. Tierheilk. **129**, 193-203.
- 29.) Hopkins, R.S., Olmstedt, R., Istre, G.R. (1984):
Endemic *Campylobacter jejuni* infection in Colorado: identified risk factors.
Am. J. Publ. Health **74**, 249-250.
- 30.) Humphrey, T.J., Henley, A., Lanning, D.G. (1993):
The colonization of broiler chickens with *campylobacter jejuni*: some epidemiological investigations.
Epidemiol. Infect. **110**, 601-607.
- 31.) ISO 10272: (1995), FDA Bacteriological Analytic Manual 8th Edition/1995.
- 32.) Jakobs-Reitsma, W.F. (1997)
Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry.
Vet. Quart. **19**:113-117.
- 33.) Jacobs-Reitsma, W.F., Bolder, N.M., Mulder, R.W.A.W. (1994):

Cecal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in Dutch broiler flocks at slaughter:
A one-year study.
Poultry Science **73**, 1260-1266.

- 34.) Jacobs-Reitsma, W.F., Giessen, van de, A.W., Bolder, N.M., Mulder, R.W.A.W. (1995):
Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms.
Epidemiol. Infect. **114**, 413-421.
- 35.) Jones, D.M, Eldridge, J., Dale, B. (1980):
Serological response to *Campylobacter jejuni* / *coli* infection.
J. Clin. Pathol. **33**, 767-769.
- 36.) Jones, D.M., Sutcliffe, E.M., Curry, A. (1991):
Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*.
J. Gen. Microbiol. **137**, 2477-2482.
- 37.) Kallowa, T., Kallowa, C. (1989):
Vorkommen und Überlebensverhalten von *Campylobacter jejuni* auf der
Schalenoberfläche von Hühnereiern.
Mh. Vet.-Med. **44**, 63-65.
- 38.) Kapperud, G., Skjerve, E., Vik, L., Hauge, K., Lysaker, A., Aalmen, I., Ostroff, S.M.,
Potter, M. (1993):
Epidemiological investigation of risk factors for *campylobacter* colonization in
Norwegian broiler flocks.
Epidemiol. Infect. **111**, 245-255.
- 39.) Karmali, M.A., Skirrow, M.B. (1984):
Taxonomy of the Genus *Campylobacter*.
In: Butzler, J.P. (Ed.): *Campylobacter* infection in man and animals. CRC Press, Inc.,
Boca Raton / Florida, 1-20.
- 40.) Kazwala, R.R., Collins, D., Hannan, J., Crinion, R.A.P., O'Mahony, H. (1990):
Factors responsible for the introduction and spread of *Campylobacter jejuni* infection
in commercial poultry production.
Vet. Rec. **31**, 305-306.
- 41.) King, E.O. (1957):
Human infections with *vibrio fetus* and a closely related *vibrio*.
J. Infect. Dis. **101**, 119-129.
- 42.) Lawson, A.J., Shafi, M.S., Pathak, K., Stanley, J. (1998):
Detection of *Camp.* in gastroenteritis: Comparison of direct PCR assay of faecal
samples with selective culture.
Epidemiol. Inf. **121**, 547-553.
- 43.) Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J. (1981):
Serotyping by slide agglutination of *campylobacter jejuni* and epidemiology.
Lancet **14**, 1103-1104.

- 44.) Mandal, B.K., DeMol, P., Bultzer, J.P., Eds. (1984):
Clinical aspects of Campylobacter infections in humans. In: Campylobacter infections in man and animals.
CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 21-31.
- 45.) Marshall, S.M., Melito, P.L., Woodward, D.L., Johnson, W.M., Rodgers, F.G., Muley, M.R. (1999):
Rapid identification of Campylobacter, Arcobacter, and Helicobacter isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA.
J. Clin. Microbiol. **37**, 4158-4160.
- 46.) Mills, S.D., Kuzniar, B., Shames, B., Kurjanczyk, L.A., Penner, J.L. (1992):
Variation of the O antigen of Campylobacter jejuni in vivo.
J. Med. Microbiol. **36**, 215-219.
- 47.) Munroe, D.L., Prescott, J.F., Penner, J.L. (1983):
Campylobacter jejuni and Campylobacter coli serotypes isolated from chickens, Cattle and pigs.
J. Clin. Microbiol. **18**, 877-881.
- 48.) Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (1999):
Manual of Clinical Microbiology.
7. ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 49.) NCCL guidelines (1999):
Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard.
NCCLS document M31-A, Vol. 19.
- 50.) Neill, S.D., Campbell, J.N., O'Brien, J.J. (1985):
Egg Penetration by Campylobacter jejuni.
Avian Pathology **14**, 313-320.
- 51.) Nicholson, M.A., Patton, C.M. (1995):
Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by Campylobacter species.
J. Clin. Microbiol. **5**, 1341-1343.
- 52.) Notermans, S. (1994):
Epidemiology and surveillance of Campylobacter infections.
Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis. Bilthoven, 25.-27. April 1994, Niederlande, 35-44.
- 53.) Oyofe, B.A., Thornton, S.A., Burr, D.H., Trust, T.J., Pavlovskis, O.R., Guerry, P. (1992):
Specific detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by using PCR.
J. Clin. Microbiol. **30**, 2613-2619.

- 54.) Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M-A., Rutherford, K.M., Van Vliet, A.H.M., Whitehead, S., Barrell B.G. (2000):
The genome sequence of the food borne pathogene *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences.
Nature **403**, 665-668.
- 55.) Pearson, A.D., Greenwood, M., Healing, T.D., Rollins, D., Shahmat, M., Donaldson, J., Colwell, R.R. (1993):
Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*.
Appl. Environ. Microbiol. **59**, 987-996.
- 56.) Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Feltham, R.K.A., Healing, T.D., Donaldson, J., Jones, D.M., Colwell, R.R. (1996):
Microbial Ecology of *Campylobacter jejuni* in a United Kingdom Chicken Supply Chain: Intermittent Common Source, Vertical Transmission and amplification by Flock Propagation.
Appl. Environ. Microbiol. **62**, 4614-4620.
- 57.) Penner, J.L., Hennessy, J.N. (1980):
Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens.
J. Clin. Microbiol. **12**, 732-737.
- 58.) Pokamunski, S., Kass, N., Borochoovich, E., Marantz, B., Rogol, M. (1986):
Incidence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks monitored from hatching to slaughter.
Avian Path. **15**, 83-92.
- 59.) Popovic-Uroic, T., Patton, C.M., Nicholson, M.A., Kiehlbauch, J.A. (1990):
Evaluation of indoxylacetate hydrolysis test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wollinella* species.
J. Clin. Microbiol. **10**, 2335-2339.
- 60.) Rivoal, K., Denis, M., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G. (1999):
Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination.
Lett. Appl. Microbiol. **29**, 370-374.
- 61.) Rosef, O., Gondrosen, B., Kapperud, G., Unerdal, B. (1983):
Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild animals in Norway.
Appl. Environ. Microbiol. **46**, 855-859.

62.) Sachs, L. (1997):

Angewandte Statistik, 8. Auflage, Springer, 467 – 473.

- 63.) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):
Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 64.) Sang, F.C., Shane, S.M., Yogasundram, K., Hagstad, H.V., Kearney, M.T. (1989):
Enhancement of *Campylobacter jejuni* Virulence by Serial Passage in Chicks.
Avian Diseases **33**, 425-430.
- 65.) Schoeni, J.L., Doyle, M.P. (1992):
Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by caecum colonizing bacteria producing anti-C. jejuni metabolites.
Appl. Environ. Microbiol. **58**, 664-670.
- 66.) Schoeni, J.L., Wong, A.C.L. (1994):
Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria.
Appl. Environ. Microbiol. **60**, 1191-1197.
- 67.) Skirrow, M.B. (1977a):
Campylobacter enteritis – the first 5 years.
J. Hyg. Camb. **89**, 175-184.
- 68.) Skirrow, M.B. (1977b):
Campylobacter enteritis: a „new“ disease.
Br. Med. J. **2**, 9-11.
- 69.) Smibert, R.M. (1984):
Genus *Campylobacter* Sebald und Veron.
In Krieg, N. R., Holt, J. G. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, 111-118.
- 70.) Smitherman, R.E., Genigeorgis, C.A., Farver T.B.(1984):
Preliminary observations on the occurrence of *Campylobacter jejuni* at four California chicken ranches.
J. Food Protection **47**, 293-298.
- 71.) Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhorst, F.E., On, S.L.W., Porter, A., Owen, R.J., Kösters, M. (1994):
Helicobacter pullorum sp.nov. – genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and human patients with gastroenteritis.
Microbiology **140**, 3441-3449.
- 72.) Steele, M., McNab, B., Fruhner, L., DeGrandis, S., Woodward, D., Odumeru, J.A. (1998):
Epidemiological typing of *Campylobacter* isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping and biotyping.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2346-2349.

- 73.) Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Weiner, S., Rump, J-A., Deissler, W., Bereswill, S., Kist, M. (1997):
Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis.
Scand. J. Infect. Dis. **29**, 315-318.
- 74.) Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Kist, M. (1999):
Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples.
FEMS Microbiology Letters **179**, 227-232.
- 75.) Stern, N.J. (1992):
Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry.
In: Nachamkin, I., Blaser, M.J., Tompkins, L.S. (Hrsg.): *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 49-60.
- 76.) Stern, N.J. (1994):
Mucosal competitive exclusion to diminish colonization of chickens by *Campylobacter jejuni*.
Poultry Science **73**, 402-407.
- 77.) Stern, N.J. (1995):
Influence of Season and refrigerated storage on *Campylobacter* spp. contamination of broiler carcasses.
J. Appl. Poult. Res. **4**, 235-238.
- 78.) Stern, N.J., Rohbach, M.C. (1995):
Nondestructive sampling of live broilers for *Campylobacter* spp..
J. Appl. Poultry Res. **4**, 182-185.
- 79.) Tauxe, R.C., Patton, C.M., Edmonds, P., Barrett, T.J., Brenner, D.J., Blake, P.A. (1985):
Illness associated with *Campylobacter laridis*, a newly recognized *Campylobacter* species.
J. Clin. Microbiol. **21**, 222-225.
- 80.) Thompson, L.M.III, Smibert, R.M., Johnson, J.L., Krieg, N.R. (1988):
Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*.
Int. J. Syst. Bacteriol. **38**, 190-200.
- 81.) Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K., Brenner, D.J. (1987):
Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington.
J. Clin. Microbiol. **9**, 1747-1752.

- 82.) Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De Ley, J. (1991):
Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wollinella* Taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov..
Int. J. Syst. Bacteriol. **41**, 88-103.
- 83.) Vandamme, P., De Ley, J. (1991):
Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*.
Int. J. Syst. Bacteriol. **41**, 451-455.
- 84.) Van de Giessen, A. W., Mazurier S. I., Jacobs-Reitsma, W., Jansen, W., Berkers, P., Ritmeester, W., Wernars, K. (1992):
Study on the Epidemiology and Control of *Campylobacter jejuni* in Poultry Broiler Flocks.
Appl. Environ. Microbiol. **58**, 1913-1917.
- 85.) Van de Giessen, A.W., Bloernberg, B.P.M., Ritmeester, W.S., Tilburg, J.J.H.C. (1996):
Epidemiological study on risk factors and risk reducing measures for *Campylobacter* infections in Dutch broilers flocks.
Epidemiol. Infect. **117**, 245-250.
- 86.) Van de Giessen, A.W., Tilburg, J.J.H.C., Ritmeiser, W.S., Plas, van der, J. (1998):
Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measurs.
Epidemiol. Infect. **121**, 57-66.
- 87.) Van der Plas, J., Koster, D.S., Havekes, W.A.L.M., Hofstra, H., Werop, A.F.W., Schouls, L., Weijtens, M.J.B.M., Urlings, H.A.P., Bijker, P.G.H. (1994):
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) typing of *Campylobacter* strains. Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of *Campylobacteriosis*. Bilthoven 25-27. April 1994, Niederlande, 103-110.
- 88.) Vanniasinkam, T., Lanser, J.A., Barton, M.D. (1999):
PCR for the Detection of the *Campylobacter* spp..
Lett. Appl. Microbiol. **28**, 52-56.
- 89.) Wallace, J.S., Stanley, K.N., Currie, J.E., Diggle, P.J., Jones, K. (1997):
Seasonality of thermophilic *Campylobacter* populations in chickens.
J. Appl. Microbiol. **82**, 219-224.
- 90.) Wassenaar, T.M., Newell, D.G. (2000):
Genotyping of *Campylobacter* spp..
Appl. Environ. Microbiol. **66**, 1-9.
- 91.) Weber, A. (1985):
Vorkommen von *Campylobacter jejuni* bei Tieren und die Bedeutung für den Menschen.
Tierärztl. Prax. **13**, 151-157.

- 92.) Weber, A., Schmittdiehl, E. (1988):
Zur klinischen Bedeutung von Campylobacter für Mensch und Tier.
Ber. Münch. Tierärztl. Wschr. **101**, 329-334.
- 93.) Weijtens, M.J.B.M., Van der Plas, J., Bijker, P.G.H., Urlings, H.A.P., Koster, D., Van Logtestijn, J.G., Huis in 't Veld, J.H.J. (1997):
The Transmission of Campylobacter in Piggeries, an Epidemiological Study.
J. Appl. Microbiol. **83**, 693-698.
- 94.) Wesley, I., Bryner, J.H. (1989):
Antigenic and restriction enzyme analysis of isolates of Campylobacter fetus subsp. venerealis recovered from persistently infected cattle.
Am. J. Vet. Res. **50**, 807-813.
- 95.) Willis, W.L., Murray, C. (1997):
Campylobacter jejuni seasonal recovery observations of retail market broilers.
Poultry Sci. **76**, 314-317.
- 96.) Yuki, N. (1997):
Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of Campylobacter jejuni isolated from patients with Guillain-Barré Syndrome and Miller Fisher Syndrome.
J. Infect. Dis. **76**, 150-153.
- 97.) Zoellner, B., Wuthe, H.H. (1993):
Lior-serotype variants in Campylobacter isolates from the same stool sample.
J. Med. Microbiol. **38**, 3-5.