

Aus dem Department für Nutztiere und
öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael HESS)
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie
und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Genotypischer Vergleich von *Campylobacter* isoliert aus Mastgeflügelproben am Schlachthof

Diplomarbeit
zur Erlangung der Würde einer
MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von
Dora Zacharov

Wien, November 2021

Betreuerin

Dr. med. vet. Beatrix Steßl

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Begutachter

Ao. Univ.-Prof. Dipl. ECVPH Dr. med. vet. Peter Paulsen

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Bp	Basenpaar
C.	<i>Campylobacter</i>
CCDA	Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar
CCO	<i>Campylobacter coli</i>
CDT	Cytolethal distending Toxin
CJE	<i>Campylobacter jejuni</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
g	Gramm
h	Stunde
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
IBD	Inflammatory bowel disease
ISO	International Organization for Standardization
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LK	Leerkontrolle
LPS	Lipopolysaccharid
Mbp	Megabasenpaar
min	Minute
ml	Milliliter
NTC	Non template control
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Puls-Feld Gelelektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
sec	Sekunde
SLB	Sample loading buffer
spp.	Species pluralis

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
.tiff	Tagged Image File Format
TSA	Trypton Soja Agar
TSAY	Trypton Soja Agar plus 0,6% Hefe (Yeast)
V	Volt
VBNC	Viable but non-culturable
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization

INHALT

1. EINLEITUNG	6
1.1. CAMPYLOBACTER SPEZIES UND IHRE RESERVOIR	6
1.1.1. EIGENSCHAFTEN UND NACHWEIS	6
1.1.2. VORKOMMEN, RESERVOIR	7
1.2. CAMPYLOBACTER VIRULENZFAKTOREN	8
1.2.1. MOTILITÄT UND CHEMOTAXIS	8
1.2.2. ADHÄSION	9
1.2.3. TOXINE	9
1.2.4. VBNC-STADIUM	10
1.2.5. BILDUNG VON BIOFILMEN	10
1.3. CAMPYLOBACTERIOSE	11
1.3.1. EFSA ZOOSE BERICHT 2019	12
1.3.2. HÜHNERFLEISCHKONSUM IN DEN EU-LÄNDERN – URSACHE FÜR DIE CAMPYLOBACTERIOSE	13
1.4. PRÄVALENZ AM SCHLACHTHOF UND PRÄVENTIONSMASSNAHMEN	14
1.4.1. PROBENAHE AM SCHLACHTHOF	15
1.4.2. PROZESSHYGIENEKRITERIUM (EG VO 1495/2017)	16
1.5. FRAGESTELLUNG	17
2. MATERIAL & METHODE	18
2.1. CAMPYLOBACTER ISOLATSAMMLUNG	18
2.2. DNA ISOLATION MIT CHELEX® 100 RESIN	18
2.3. CAMPYLOBACTER MULTIPLEX PCR UND GELELEKTROPHORESE	19
2.4. PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)	21
3. RESULTATE	24
4. DISKUSSION UND KONKLUSION	30
5. LITERATUR	34
6. DANKSAGUNG	41
7. EXTENDED SUMMARY	41
8. ZUSAMMENFASSUNG	42
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	44
10. TABELLENVERZEICHNIS	44
11. APPENDIX	45

1. EINLEITUNG

1.1. **CAMPYLOBACTER SPEZIES UND IHRE RESERVOIR**

1.1.1. **Eigenschaften und Nachweis**

Die taxonomische Familie *Campylobacteraceae* wird in drei Gattungen unterteilt: in *Arcobacter*, *Campylobacter* und *Sulfurospirillum*

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Campylobacteraceae>).

Campylobacter, *Helicobacter*, *Wolinella*, *Arcobacter* und *Flexispira* gehören zu einer einzigen phylogenetischen Gruppe, die sich von anderen gramnegativen Bakterien, basierend auf 16S rRNA-Sequenzierung, unterscheidet

(<https://science.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Campylobacter.htm>; eingesehen am: 23.09.2021).

Zu den wichtigsten Vertretern der thermophilen *Campylobacter* gehören: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*, welche durch Lebensmittel übertragene Campylobacteriosen verursachen

(https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html; eingesehen am: 23.09.2021).

Campylobacter spp. sind 0,2–0,8 µm × 0,5–5 µm große, gramnegative, nicht sporenbildende, spiralförmige Bakterien (WASSENAAR et al., 2006). Die meisten Vertreter der Gattung sind mit einem oder zwei Flagellen ausgestattet und führen eine korkenzieherartige Bewegung durch (SILVA et al., 2011). Thermophile *Campylobacter* wechseln unter ungünstigen Wachstumsbedingungen wie einem niedrigen pH-Wert, Trockenheit oder extreme Temperaturbedingungen (4°C - 36°C, 43°C - 60°C) in eine kokkoide Form und können auch mit kulturabhängigen Nachweismethoden nicht nachweisbar sein („viable but non-culturable“ Stadium, VBNC) (TANGWATCHARIN et al., 2006; SELBITZ et al., 2015).

Campylobacter sind Oxidase und Katalase positiv, reduzieren Nitrat und verwenden Aminosäuren und Intermediärprodukte des Trikarbonsäurezyklus als Energiequelle (BRANDIS et al., 1994).

Die Anzucht von thermophilen *Campylobacter* ist anspruchsvoll, daher ist die Verwendung von selektiven Anreicherungsmedien, Nährboden sowie optimalen Wachstumsbedingungen unerlässlich. Ein Direktausstrich aus der Probe, oder nach Selektivanreicherung auf Selektivagar mit anschließender Inkubation bei 42°C unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O₂, 10 % CO₂ und 85 % N₂), wird im

kulturabhängigen Ansatz durchgeführt (GHARST et al., 2013; SELBITZ et al., 2015; FITZGERALD et al., 2016).

Bei der *Campylobacter* Isolierung werden Medien wie Butzler Agar, Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (CCDA), Karmali Agar und Skirrow Agar verwendet (CORRY et al., 2003; ZAGHLOUL et al., 2012).

Butzler und Skirrow Agar basieren auf Pferdeblut, welches nicht nur als Nährstoff, sondern auch als Antioxidans dient (zerstört die Superoxidradikale und Peroxide). Im Vergleich zu Butzler und Skirrow Agar, sind CCDA und Karmali Agar blutfreie Selektivnährmedien. Blut wird durch Aktivkohle, Hämin, Eisensulfat und Natriumpyruvat ersetzt (ATLAS, 2004; CURTIS et al., 2011).

Die genannten Nährmedien enthalten Selektivsupplemente wie Novobiocin, Colistin, Cephazolin, Cycloheximid und Bacitracin (Butzler Agar), Vancomycin, Trimethoprim und Polymyxin B (Skirrow Agar) zur Unterdrückung der grampositiven und -negativen Konkurrenzflora sowie Amphotericin B und Cycloheximid zur Inhibierung von Schimmel (ATLAS, 2004; CURTIS et al., 2011).

Typischerweise ist *Campylobacter* in Lebensmittel, Wasser- und Umweltproben in wesentlich geringen Mengen vorhanden als in Kotproben ($10^6 - 10^8$ KBE/g) von Geflügel (UGARTE-RUIZ et al., 2012; OH et al., 2017). Aufgrund der möglicherweise niedrigen *Campylobacter* Zahl in Wasserproben, Lebensmittelproben und Umweltproben (Stiefeltupfer) ist eine Anreicherung in flüssigen Selektivnährmedien empfohlen (UGARTE-RUIZ et al., 2012). Derzeit sind drei ISO Standardmethoden zum Nachweis von *Campylobacter spp.* in Lebensmitteln (ISO 10272-1:2017, ISO 10272-2:2017) und Wasserproben empfohlen (ISO 17995:2019). Zur Durchführung von diesen ISO-Methoden werden selektive flüssige Anreicherungsmedien (Bolton und Preston Broth) und die oben genannten selektiven Agar verwendet (BENETTI et al., 2016; <https://www.iso.org/obp/ui/#search>; eingesehen am: 06.09.2021).

1.1.2. Vorkommen, Reservoir

Campylobacter haben ihr Reservoir im Gastrointestinaltrakt von Wild - und Nutztieren, sowie Hund und Katze (BOLTON et al., 2015; RAMIRES et al., 2020; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Campylobacter>; eingesehen am 23.09.2021).

Einige *Campylobacter*-Arten sind in der Lage bei Tieren Krankheiten auszulösen, wie z.B. *C. fetus* und *C. hepaticus* die bei Rindern und Schafen Aborte, sowie bei Hühnern Lebererkrankungen verursachen (LIU et al., 2018).

Campylobacter haben sich während der Evolution an die ökologischen Nischen adaptiert: die optimalen in vitro Wachstumsbedingungen spiegeln die sauerstoffarmen Bedingungen im Darmtrakt und die Körpertemperatur des Geflügels (42°C) und der Säugetiere (37°C) wider (PARK et al., 2002). *Campylobacter* sind in der Lage auch außerhalb des Wirtes in der landwirtschaftlichen Umgebung zu überleben und wurden sogar von Boden, Wasser, Staub, Gebäudeoberfläche und Luft isoliert (ELLIS-IVERSEN et al., 2012). Die Anwesenheit von *Campylobacter spp.* in Oberflächengewässern ist auf Kontaminationen durch Wildvogelkot, Ableitung von Abwässern und regenbedingten Überschwemmungen von landwirtschaftlichen Agrarnutzungsflächen zurückzuführen (ABULREESH et al., 2017). Die Lebensfähigkeit von *Campylobacter* in Wassersystemen wird durch Biofilmbildung und durch das Überleben in Protozoen, wie z.B. *Acanthamoeba polyphaga* oder *Tetrahymena pyriformis* begünstigt (INDIKOVA et al., 2015).

1.2. CAMPYLOBACTER VIRULENZFAKTOREN

Bei der Prävention und Behandlung von Campylobacteriose ist es unerlässlich die Virulenzfaktoren, deren Wirkmechanismus und Regulation näher zu betrachten. Neben der Motilität von *Campylobacter spp.* spielen auch Adhärenz, Invasion und Toxinproduktion eine Rolle im Infektionsprozess (WASSENAAR et al., 1997).

Im Gegensatz zu anderen, Durchfall verursachenden Bakterien, wurden bei *C. jejuni* bisher keine weiteren Virulenzfaktoren identifiziert. Stattdessen spielen die Wirtsfaktoren eine wesentliche Rolle für die Pathogenese: je nachdem, welchen Wirtskörper *C. jejuni* infiziert hat, werden unterschiedliche Anpassungsstrategien verfolgt (DASTI et al., 2010).

1.2.1. Motilität und Chemotaxis

Die Motilität ist essenziell in der Besiedlung des Gastrointestinaltraktes des Wirtes. *Campylobacter* zeichnen sich durch eine schnelle, durch ein polares Flagellum vermittelte Pfeilbeweglichkeit aus, die entscheidend für die Pathogenese ist (SZYMANSKI et al., 1995). Das Flagellum dient als multifunktionelles Organ, es ermöglicht *Campylobacter* sich durch hochvisköse Medien und durch die Darmperistaltik auszubreiten, ist wesentlich für die Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes und für die Invasion und Eindringen in die Epithelzellen (SILVA et al., 2011; ELM I et al., 2020).

Man geht davon aus, dass die Flagellen neben der Fortbewegung und Chemotaxis auch eine weitere wichtige Funktion erfüllen: sie dienen als Exportapparat bei der Sekretion von Virulenzproteinen

(*Campylobacter* Antigenen) während der Invasion, außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Mikrokoloniebildung, welche zur Biofilmbildung beitragen (GUERRY et al., 2007; DASTI et al., 2010).

Chemotaxis ist ein Mechanismus, durch den Bakterien chemische Hinweise wahrnehmen können und sich zu ihnen hinbewegen (KOROLIK et al., 2019).

Während der Kolonisierung von *Campylobacter* sind die primäre chemoattraktive Stoffe die Glykoproteine und die Schleimstoffe, die den Hauptbestandteil des Mucins bilden. Weitere chemoattraktive Moleküle sind metabolische Substrate wie Alpha-Ketoglutarat, Alpha-Aspartat, L-Cystein, Pyruvate, Fumarate, Nitrite (BOLTON et al., 2015). Die chemotaktische Signale werden von den Chemorezeptoren wahrgenommen, welche als Multidomänenproteine in der Zellwand vorliegen, d.h. sie nehmen die Signale wahr und übermitteln die Information (LERTSEHTAKARN et al., 2011).

1.2.2. Adhäsion

Die Adhäsion von *Campylobacter* an gastrointestinalen Epithelzellen ist eine Voraussetzung für die Kolonisierung und wird durch mehrere Adhäsine an der Bakterienoberfläche vermittelt (JIN et al., 2001).

Zahlreiche Adhäsine wurden beschrieben wie Fibronectin-bindendes Membranprotein, Oberflächenexponiertes-Lipoprotein, Autotransporter-Protein, Periplasmatisches Bindungsprotein (DASTI et al., 2010). Mehrere Studien haben berichtet, dass das Serin-Protein HtrA nicht nur bei der Adhäsion, sondern bei der Transmigration eine wichtige Rolle spielt. Eröffnen und Spalten von Zellverbindungen ermöglicht den Bakterien das parazelluläre Eindringen in die Gewebe und dort die Induktion einer Entzündung (KLEIN et al., 2016). Die Lipopolysaccharid-Molekülen (LPS – Molekülen) sind auch an der Adhärenz beteiligt, außerdem helfen sie bei der Antigen-Variation, da sie die Fähigkeit besitzen, die LPS-Antigenzusammensetzung zu verändern (BHAVSAR et al., 2006)

1.2.3. Toxine

Ein wichtiger Mechanismus mit dem die Pathogenese induziert wird ist die Produktion von Toxinen. *Campylobacter spp.* produzieren zwei Arten von Toxinen: Enterotoxine und Zytotoxine. Die Enterotoxine sind als sezernierte Proteine definiert, mit der Fähigkeit sich an die Zellrezeptoren zu binden, in die Zelle einzudringen und dort den intrazellulären zyklischen AMP-Spiegel zu erhöhen (WASSENAAR, 1997). Es gibt Beweise dafür, dass *Campylobacter*, isoliert von Patienten mit wässrigem Durchfall, in der Lage sind Enterotoxine zu produzieren. Durch erhöhen des zyklischen AMP-Spiegels der Enterozyten wird der Ionenfluss verändert, was eine übermäßige Flüssigkeitssekretion verursacht,

und in weiterer Folge wässrigen Durchfall auslöst. Die Enterotoxine sind hitzelabil, d.h. mit genügend thermischer Behandlung werden sie inaktiviert (WALKER et al., 1986).

Zytotoxine sind Proteine mit der Aufgabe bestimmte Zellen abzutöten. Je nach Art und Funktion sind sie in der Lage Poren an der Zellwand zu bilden oder entfalten ihre Wirkung intrazellulär. *Campylobacter spp.* können folgende 6 Arten von Zytotoxinen bilden: 70 kDa Zytotoxin, Vero/HeLa-Zellen Zytotoxin, „cytolethal distending Toxin“ (CDT), Shiga-like Toxin, hämolytische Zytotoxin und Hepatotoxin (WASSENAAR, 1997).

1.2.4. VBNC-Stadium

Es wird angenommen, dass bestimmte Bakterien als Folge von Umweltstress in einen lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren („viable but non-culturable“ - VBNC) Zustand übergehen (RAMAMURTHY et al., 2014).

Über die VBNC Form von *C. jejuni* wurde erstmals von Rollins und Colwell (1986) berichtet. Angesichts der anspruchsvollen Natur von *Campylobacter* ist der Übergang in VBNC-Zustand relativ leicht zu induzieren, kann nach Sauerstoffeinwirkung, Temperaturänderung oder fehlendem Nährstoffangebot auftreten (ROLLINS & COLWELL, 1986). In diesem Stadium können die Zellen nicht auf Standard-Wachstumsmedien wachsen, da sie sich in einem Zustand sehr geringer Stoffwechselaktivität befinden und besondere Bedingungen benötigen, um sich wieder teilen zu können (OLIVER, 2005).

1.2.5. Bildung von Biofilmen

Die Fähigkeit der Bildung von Biofilmen ist ein wichtiger Virulenzfaktor von den *Campylobacter*. Dieser Mechanismus ermöglicht es *Campylobacter spp.* unter ungünstigen Bedingungen eine Nährstoffversorgung und den Schutz vor antimikrobiellen- und Desinfektionsmitteln (JOHNSON et al., 2017).

Die *Campylobacter* Biofilmproduktion sichert das Überleben außerhalb des Wirtes, sowohl unter atmosphärischen Bedingungen, als auch in Wassersystemen, die bis zu doppelt so lange ermöglicht wird (REUTER et al., 2010).

Campylobacter persistieren eher in der Umwelt in Biofilmen gebildet aus diversen Bakterienarten, wie *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus aureus* (LAMAS et al., 2018).

Ein Problem bei der Geflügelschlachtung stellt die unzureichende Entfernung von organischem Material (Gemisch aus Kohlenhydraten, Proteinen, Lipiden) von Gerätschaften (Rupfmaschine, Brühbecken, Darmentfernung etc.), welches ein ideales Medium für die Vermehrung von Mikroorganismen darstellt (MELO et al., 2017).

C. coli im Vergleich zu *C. jejuni* Isolaten, beide isoliert aus Hühnerdärmen, können deutlich besser Biofilme bilden (KIM et al., 2017). Das Vorhandensein von *flaA*-, *cadF*-, *luxS*-, *dnaJ*-, *htrA*-, *cbrA*- und *sodB*-Genen in *C. jejuni* Stämmen erhöht das Potenzial für die Biofilmbildung (MELO et al., 2017).

KIM et al. (2017) haben in ihrer Studie nachgewiesen, dass obwohl die Motilität schlecht mit der Biofilmbildung von *Campylobacter* korreliert, das Vorhandensein von Geißeln einen wesentlichen Einfluss hat. Unter aeroben Bedingungen wird die Biofilmbildung von *C. jejuni* stimuliert und löst die Bildung von VBNC-Zellen aus (OH et al., 2017). Die Fähigkeit der Biofilmzellen in diesem Stadium zu überleben macht sie daher potenziell gefährlich, da sie an Einrichtungen persistieren können, ohne mit herkömmlichen Methoden nachgewiesen zu werden (LAMAS et al., 2018).

1.3. CAMPYLOBACTERIOSE

Campylobacteriose wird durch thermotoleranten *Campylobacter* Arten verursacht, die direkt durch Tierkontakt oder tierische Produkten auf den Menschen übertragen werden (GARRITY et al., 2004; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Campylobacter>; eingesehen am: 23.09.2021). Masthühner sind asymptomatische Träger und stellen damit die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen dar (ELLIS-IVERSEN et al., 2012). Der Hauptübertragungsweg findet über die Nahrung, vor allem über nicht ausreichend erhitztes Geflügelfleisch und Fleischprodukte statt (RASSCHAERT et al., 2020). Eine weitere Übertragung kann ebenfalls über Rohmilch und kontaminiertes Wasser erfolgen (SHEPPARD et al., 2009). Bei der Verarbeitung von rohem Geflügelfleisch sind Kreuzkontaminationen auf Lebensmitteln zum rohen Verzehr (z.B. Salat) durch saubere Küchenhygiene zu vermeiden (CARDOSO et al., 2021).

Die Campylobacteriose ist eine der vier wichtigsten globalen Ursachen für Durchfallerkrankungen beim Menschen (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Campylobacter>; eingesehen am: 23.09.2021). *C. jejuni* und *C. coli* sind die am häufigsten gemeldeten Spezies, die eine Darminfektion verursachen und dabei EU-weit 90 % bzw. 5-10 % der gemeldeten Fälle ausmachen (KOVALENKO et al., 2014; BAALI et al., 2020).

Bereits eine Infektionsdosis von 500 koloniebildenden Einheiten (KBE) *C. jejuni* kann bei den Menschen zu einer Enterokolitis mit einer mittleren Inkubationszeit von 1-5 Tagen führen (ROBINSON et al., 1979; SKARP et al., 2016; JOHNSON et al., 2017). Zu den häufigsten klinischen Symptomen gehören Bauchschmerzen, blutig-wässriger Durchfall, hohes Fieber, Kopfschmerzen, Erbrechen und Übelkeit, die Erkrankung ist aber meistens selbstlimitierend. Bei kleinen Kindern und Patienten mit eingeschränktem Immunsystem kann die Infektion ohne Behandlung fatal enden (SKARP et al., 2016).

In schwereren Fällen kann die Infektion zu einer Bakteriämie, Hepatitis (KORMAN et al., 1997), Guillain-Barré-Syndrom (SCALLAN et al., 2015), IBD (Inflammatory Bowel Disease) (KALISCHUK et al., 2010) oder reaktiver Arthritis führen (POPE et al., 2007).

1.3.1. EFSA Zoonose Bericht 2019

Das EU-System für die Überwachung und Sammlung von Informationen über den Zoonosen basiert auf der Zoonosen-Richtlinie 2003/99/EG. Die EU-Mitgliedstaaten sind verpflichtet Daten über die aufgelisteten Zoonosen, Zoonoseerreger, antimikrobielle Resistenzen und lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche zu erheben und diese jährlich der Europäischen Kommission zu übermitteln. Diese Berichte werden an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) weitergeleitet die diese Daten zusammenfasst und zu veröffentlichen (Richtlinie 2003/99/EG).

Im Jahr 2019 war Campylobacteriose die am häufigsten gemeldete Zoonose in der EU, welche alleine fast 50% aller gemeldeten Fällen ausgemacht hat. Die häufigsten Ursachen für die lebensmittelbedingte Erkrankung waren Hühnerfleisch und Milch (EFSA & ECDC 2021).

Es wurden insgesamt 220.682 Fälle in der EU registriert mit einer Meldequote von 59,7 Fälle pro 100.000 Einwohnern. Die höchsten gemeldeten Zahlen stammen aus Deutschland (61.526 Fälle) und dem Vereinigten Königreich (58.718 Fälle). Die Tschechische Republik und Spanien schließen mit den dritt- und vierthöchsten Meldezahlen an (23.169 und 9.723 Fälle). In den restlichen europäischen Mitgliedstaaten lagen die gemeldeten *Campylobacter* Infektionen unter 8.000. Die höchsten länderspezifischen Melderaten, ausgerechnet pro 100.000 Einwohnern, wurden in der Tschechischen Republik (215,0), in der Slowakei (141,1), in Dänemark (93,0) und in den Vereinigten Königreich (88,1) beobachtet (EFSA & ECDC 2021).

Zwischen 2015 und 2019 gab in der EU eine deutliche Saisonabhängigkeit der bestätigten Campylobacteriose-Fällen: die Spitzenwerte traten in den Sommermonaten auf. Es wurde aber ein weiterer Höhepunkt zwischen Ende Dezember und Jänner in den EU-Mitgliedstaaten registriert (EFSA & ECDC 2021).

In Österreich liegt im Jahr 2018 und 2019 Campylobacteriose an der ersten Stelle der gemeldeten lebensmittelbedingten bakteriellen Infektionskrankheiten mit 7.999 und 6.588 gemeldeten Fällen (<https://www.ages.at/service/service-oeffentliche-gesundheit/referenzzentralen/rz-Campylobacter/>; eingesehen am: 23.09.2021).

Der Sommerpeak der Campylobacteriose stimmt mit höherer Prävalenz von *Campylobacter* bei Hühnerherden während Sommermonaten zusammen (SIBANDA et al., 2018). Mögliche Ursachen für

die Saisonalität von Campylobacteriose stellen die verstärkte Reiseaktivitäten in Sommermonaten und während der Ferien und Festtage dar (BLESS et al., 2017). Weitere Zusammenhänge zwischen Campylobacteriose und erhöhten Temperaturen bilden der vermehrte Freizeitaktivität (Schwimmen in Freien), vermehrter Verzehr von Obst und Salat (Kreuzkontamination von Speisen), Veränderungen in Lebensmittelzubereitung (Grillen) (LAKE et al., 2019). In Ländern mit einem geringen Anteil von Hühnerbeständen, wie Finnland, Norwegen und Schweden, spielen die reisebedingten Infektionen und der Verzehr von importiertem Hühnerfleisch eine wichtige Rolle (SKARP et al., 2016).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hühnerfleisch zwar für eine bestimmte Anzahl von Campylobacteriose-Fällen verantwortlich ist, ist aber nicht der Hauptgrund für das saisonale Krankheitsmuster (WILLIAMS et al., 2015).

1.3.2. Hühnerfleischkonsum in den EU-Ländern – Ursache für die Campylobacteriose

Geflügelfleisch ist das Fleisch mit dem zweithöchstem Verbrauch in der Europäischen Union ([https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2019/644195/EPRS_IDA\(2019\)644195_DE.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2019/644195/EPRS_IDA(2019)644195_DE.pdf); eingesehen am: 23.09.2021).

Weltweit werden jährlich etwa 12 kg Geflügelfleisch pro Kopf verzehrt. Der individuelle Verbrauch ist innerhalb der EU sehr unterschiedlich, z.B. wird Geflügelfleisch in Deutschland von jüngeren (14-29 Jahre), in Ungarn von älteren (>65 Jahre) bevorzugt (<https://www.tagesspiegel.de/wirtschaft/erste-bundesweite-umfrage-vor-allem-junge-leute-essen-gefluegel/11556832.html>); <https://www.statista.com/statistics/1231907/hungary-annual-meat-consumption-by-age-group-and-type/>; eingesehen am: 23.09.2021).

Die Länder mit dem höchsten Pro-Kopf-Konsum von Geflügel in der EU sind: Portugal, Irland und Ungarn - hier beträgt der Verbrauch durchschnittlich 30 kg pro Person und Jahr. (<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/186634/umfrage/pro-kopf-verbrauch-von-gefluegelfleisch-seit-2001/>; eingesehen am: 23.09.2021).

Im Jahr 2019 betrug der pro-Kopf-Konsum von Geflügelfleisch in Österreich 12,4 kg. (https://amainfo.at/fileadmin/user_upload/Fotos_Dateien/amainfo/Presse/Marktinformationen/Produktion/Pro_Kopf_Verbrauch_Fleisch.pdf; eingesehen am: 23.09.2021).

Das Verhalten der Verbraucherinnen/ der Verbraucher hat sich in den letzten Jahren stark verändert: der Konsum von Convenience Food, Ready-to-eat Food hat zugenommen (<https://www.sueddeutsche.de/wirtschaft/fertiggerichte-convenience-produkte-1.4523733>;

eingesehen am: 23.09.2021). In den Lebensmittelgeschäften hat sich die Anzahl der marinierten Hühnerfleischzubereitungen, gekochten oder verzehrfertigen Erzeugnisse erhöht (SAMPERS et al., 2012).

Der Verzehr von Barbecue, Tischgrill und Fleischfondue ist beliebt und könnte die Übertragung einer Infektion mit *Campylobacter* begünstigen (BLESS et al., 2017).

1.4. PRÄVALENZ AM SCHLACHTHOF UND PRÄVENTIONSMASSNAHMEN

Campylobacter ist einer der wichtigsten lebensmittelbedingten Krankheitserreger auf der Welt und hat große Auswirkungen auf die Belastung der öffentlichen Gesundheit (REICH et al., 2018).

Da das Risiko einer Campylobacteriose verursacht durch den Verzehr von Hühnerfleisch nicht vollständig minimiert werden kann, erfordert die Bekämpfung der Campylobacteriose eine mehrschichtige Interventionsstrategie. Das Ziel dieser Strategie ist die Prävalenz auf Herdenebene zu reduzieren und die Kreuzkontamination während der Geflügelschlachtung zu verringern (EFSA BIOHAZ, 2020; <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2020.6090>; eingesehen am: 23.09.2021).

Da die Primärproduktion eine entscheidende Rolle bei der *Campylobacter*-Kontamination von Hühnerherden spielt, hat die Verringerung der Prävalenz auf Herdenebene einen positiven Effekt auf die weiteren Glieder der Lebensmittelkette (Schlachtung, Einzelhandel, Verbrauch) (MEUNIER et al., 2016). Es sind mehrere Bekämpfungsstrategien auf Betriebsebene anwendbar. Zu den aktuell eingesetzten Biosicherheitsmaßnahmen auf Ebene des landwirtschaftlichen Betriebes zählen die Dekontamination von Einstreu, die hygienische Aufbereitung von Trinkwasser z.B. mit Chlordioxid oder organischen Säuren, das Zufüttern von Probiotika, essentiellen Ölen und effektiven Mikroorganismen. Außerdem besteht die Möglichkeit der Anwendung von Impfungen, Bakteriophagen und Bakteriozine um die Erreger aus dem Darmtrakt von Geflügel zu eliminieren oder zumindest zu reduzieren (MEUNIER et al., 2016).

Die oft geringe Ausgangskontamination von *Campylobacter spp.* auf Herdenebene nimmt während des Transports und des Schlachtprozesses zu (PEREZ-ARNEDO et al., 2021). Durchschnittlich sind 60 – 80 % der Herden, die im Schlachthof ankommen, mit *Campylobacter* kolonisiert (HERMANS et al., 2011). Am Schlachthof gelten die Phasen des Entleerens, Ausblutens, Waschens und Kühlens als kritische Punkte. Während des Schlachtprozesses kann der Verdauungstrakt versehentlich beschädigt werden, was zu einem Austritt des Darminhaltes führt (MALHER et al., 2011; SORO et al., 2020). Das Brühwasser kann mit Staub und Darminhalt verschmutzt sein, was eine erhebliche Kontaminationsgefahr für später

geschlachtete Karkassen darstellt (PEREZ-ARNEDO et al., 2021). Während des Brühprozesses und Rupfen eröffnen sich die Haarfollikel wo sich *Campylobacter* anheften können und nach dem Abkühlen in den Follikeln eingeschlossen werden (TANIGUCHI et al., 2021).

Die hygienische Durchführung der genannten Arbeitsschritte ist von wesentlicher Bedeutung: während der Verarbeitung am Schlachthof können die Tiere von negativen Herden am Ende einer Schlachtlinie durch Darminhalt, oder durch kontaminierte Umgebung leicht kreuzkontaminiert werden (HANSSON et al., 2010; MALHER et al., 2011; SORO et al., 2020).

Am Ende der Verarbeitungslinie werden je nach Land unterschiedliche Produktarten angeboten: frische oder tiefgefrorene Schlachtkörper, ganz oder portioniert, wodurch das Infektionsrisiko unterschiedlich hoch ist. Generell sind hautlose Portionen (Brustfilets) weniger mit *Campylobacter* belastet als Portionen mit Hühnerhaut (SKARP et al., 2016).

1.4.1. Probenahme am Schlachthof

Um die Wirksamkeit bestimmten Präventionsmaßnahmen auf Betriebsebene bewerten zu können, ist es erforderlich den *Campylobacter*-Status von den Broilerherden mit geeigneten Probenahmeverfahren zu überwachen (INGRESA-CAPACCIONI et al., 2015). Für den Nachweis von *Campylobacter* in Masthühnerbetrieben werden verschiedene Probenahmeverfahren eingesetzt, unter anderem Kloakenabstriche, Stuhlproben, Stiefelproben und Blinddarmproben von geschlachteten Tieren (INGRESA-CAPACCIONI et al., 2015; JOSEFSEN et al., 2015).

Die Untersuchung und Zählung von *Campylobacter* in Blinddarmproben und auf Broilerkarkassen (Hals- und Brusthautproben) nach der Schlachtung und nach dem Kühlen, zählen in der EU zu den harmonisierten epidemiologischen Indikatoren (EFSA, 2012). Die gelieferten Informationen über *Campylobacter*-positiven Chargen vom Schlachthof dienen auch als Rückkopplung-Informationen dem Haltungsbetrieb mit dem Ziel die Überwachungstätigkeiten und Betriebsaudits zu verbessern und unterstützen (NASTASIJEVIC et al., 2020).

Der Blinddarm ist am meisten belastetes Organ bei *Campylobacter* positiven Masthühnerherden und stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Kreuzkontamination von den Schlachtkörpern dar (SAKARIDIS et al., 2018). Die Anzahl von den *Campylobacter* bei kolonisiertem Geflügel in Cäcum ist meistens sehr hoch, bis zu $10^4 - 10^{7,9}$ KBE/g Darminhalt (AWAD et al., 2018; NASTASIJEVIC et al., 2020).

Im Jahr 2018 wurden in Österreich insgesamt 449 Cäcumproben von Broilerhühnern am Schlachthof gesammelt. Davon waren 249 (55,5 %) positiv auf *Campylobacter* spp. getestet: in 84 Blinddarmproben waren *C. coli* und in 181 Blinddarmproben waren *C. jejuni* nachweisbar (EFSA, 2020;

<https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/zoocountryreport18at.pdf>; eingesehen am: 23.09.2021).

Die Risikobewertungen haben ergeben, dass eine Verringerung der *Campylobacter*-Anzahl im Produkt die Inzidenz von Campylobacteriose deutlich reduzieren kann (REICH et al., 2018). Zur Überwachung der Prozesshygiene während der Schlachtung wird u.a. *Campylobacter* herangezogen (GRAVNING et al., 2021). Da die Halshaut signifikant stärker mit *Campylobacter* belastet ist als die Brusthaut, werden Halshautproben von Broilerkarkassen standardmäßig entnommen um die Kontaminationsgrad mit *Campylobacter* zu beurteilen können (HUTCHISON et al., 2019).

1.4.2. Prozesshygienekriterium (EG VO 1495/2017)

Laut der VO (EG) 178/2002 dürfen die Lebensmittelunternehmer nur sichere Lebensmittel herstellen und in Verkehr bringen. Die Lebensmittelunternehmer müssen sicherstellen, dass auf allen ihrer Kontrolle unterstehende Produktions-, Verarbeitung- und Vertriebsstufen von Lebensmitteln die allgemeinen Hygienevorschriften erfüllen (VO (EG) 852/2004). Während der Herstellung müssen die mikrobiologischen Kriterien für bestimmte Mikroorganismen und die Prozesshygienekriterien eingehalten werden (VO (EG) 2073/2005). Für die Lebensmittel tierischen Ursprungs gelten spezifische Hygienevorschriften, welche von dem Lebensmittelunternehmer erfüllt werden müssen (VO (EG) 853/2004).

Nach der die Campylobacteriose jährlich die häufigste gemeldete lebensmittelbedingte Krankheit in der EU ist, hat die EU Kommission im August 2017 die VO (EG) 2073/2005 in Bezug auf *Campylobacter* in Schlachtkörpern von Masthähnchen geändert. Danach im Jahr 2018 ist EU-weit ein neues Prozesshygienekriterium für *Campylobacter* in Kraft getreten, mit dem Ziel: die Kontamination der Schlachtkörper beim Schlachtprozess soll unter Kontrolle gehalten werden und damit soll das Risiko für die öffentliche Gesundheit durch den Verzehr von Masthähnchenfleisch minimiert werden (Verordnung (EU) 2017/1495).

Für die Kontrolle der *Campylobacter* an den Schlachtkörpern wird die EN ISO 10272-2 analytische Referenzmethode verwendet. Die Halshaut-Proben welche für die Untersuchung auf die Einhaltung der Prozesshygienekriterien für die *Salmonella* verwendet werden, dürfen auch für *Campylobacter*-Analyse verwendet werden.

Ab dem Jahr 2018 geltende Prozesshygienekriterien für *Campylobacter* spp. sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: *Campylobacter* als Prozesshygienekriterium in Broilerkarkassen.

Lebensmittel-kategorie	Mikroorganismen	Probenahme-plan		Grenz-werte		Analytische Referenz-methode	Stufe, für die das Kriterium gilt	Maßnahmen im Fall unbefriedigender Ergebnisse
		N	C	M	M			
Schlachtkörper von Masthähnchen	<i>Campylobacter</i> spp.	50 (5)	c = 20 Ab dem 1.1.2020: c = 15; Ab dem 1.1.2025: c = 10	1 000 KBE/g		EN ISO 10272-2	Schlachtkörper nach dem Köhlen	Verbesserungen in der Schlachthygiene, Überprüfung der Prozesskontrolle und der Herkunft der Tiere sowie der Maßnahmen im Bereich der Biosicherheit in den Herkunftsbetrieben

Quelle: Verordnung (EU) 2017/1495 der Kommission vom 23. August 2017 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 in Bezug auf *Campylobacter* in Schlachtkörpern von Masthähnchen.

1.5. FRAGESTELLUNG

Im Rahmen des Projektes "Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation FFOQSI" wurde eine Kooperation im Non-K Projektbereich initiiert, um mit der Geflügelindustrie und privaten Diagnostiklabors zusammenzuarbeiten, mit dem Schwerpunkt „Prävention thermophiler *Campylobacter* Kontamination auf Geflügelfleisch“.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war die Speziesbestätigung und Subtypisierung von *C. jejuni* und *C. coli* isoliert aus Darmkonvolut- und Nackenhautproben von Mastgeflügel. Ein *Campylobacter* Isolatset (n=150), das 16 Mastbetrieben und fünf Schlachtbetrieben zuordenbar ist, stand zur Verfügung. Davon repräsentieren 1/3 und 2/3 der *Campylobacter* Isolate Halshaut und Darmkonvolutproben. Die Studie soll einen Überblick über die genetische Vielfalt der *Campylobacter*-Spezies in verschiedenen österreichischen Broilerbetrieben geben und mit Isolaten von der Halshaut nach dem Schlachtprozess vergleichen (Abbildung 1).

Die Hypothese ist, dass *Campylobacter* isoliert von Nackenhaut (nach dem Schlachtprozess) nicht ident mit den Genotypen präsent in Darmkonvolutproben ist.

Die Studie soll schlachthauspezifische Genotypen identifizieren und der Genotypen-Diversität in Mastbetrieben gegenüberstellen.



Abbildung 1: Infektionskette und Nachweis von *Campylobacter*.

2. MATERIAL & METHODE

2.1. *CAMPYLOBACTER* ISOLATSAMMLUNG

Es wurden insgesamt 165 kryokonservierte *Campylobacter* Isolate (1/3 Halshautisolaten, 2/3 Darmkonvolutisolate und ein Isolat aus Tränkewasser) von dem Privatlabor Hygienicum® GmbH dem Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen zur Verfügung gestellt. Das Isolatset wurde auf Pferdeblutagar ausgestrichen und für 24-48 h bei 42°C unter mikroaerophilen Bedingungen (5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂ Gas; Linde Gas GmbH, Stadl-Paura, Österreich) angezchtet. Die verwendete Pferdeblutagarplatten wurden aus Columbia Agar (Thermo Fisher Inc., Oxoid, Waltham, USA) unter Zugabe von 5% Laked horse blood (Thermo Fisher Inc., Oxoid SR0048C), *Campylobacter* growth supplement (Thermo Fisher Inc., Oxoid SR0323E) und Skirrow selective supplement (Thermo Fisher Inc., Oxoid SR0069E) hergestellt.

2.2. DNA ISOLATION MIT CHELEX® 100 RESIN

Die DNA-Extraktion von den *Campylobacter* Isolaten wurde nach dem Protokoll von Walsh et al. (1991) unter Verwendung von Chelex-100® Resin (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) durchgeführt. Dazu wurde mit der Impföse (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 1µl *Campylobacter* Koloniematerial von der Selektivagarplatte abgenommen, in 100 µl 0,01 M Tris HCl Puffer pH 7.0 (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) suspendiert und sorgfältig gevortext. Im nächsten Schritt wurde 400 µl Chelex-

100[®] Resin (Bio-Rad Laboratories Inc.) zur Suspension hinzugefügt, kurz durchgemischt und 10 min lang bei 100°C auf dem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA und der Zelldetritus für 5 sec lang bei 15000 x g durch Zentrifugation getrennt. Die sich im oberen Röhrchenbereich sich befindende DNA (100 µl) wurde in 1,5 ml sterile Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) transferiert. Die nach dieser Methode extrahierte DNA wurde direkt als in der Multiplex-PCR zur *Campylobacter* Spezies Differenzierung verwendet oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3. CAMPYLOBACTER MULTIPLEX PCR UND GELELEKTROPHORESE

Die Bestätigung der *Campylobacter*-Spezies erfolgte mit der Multiplex PCR nach Wang et al. (2002). Mit diesem PCR-Verfahren wurden die speziesspezifische Gene, also für *C. coli* (*glyA*) und *C. jejuni* (*hipO*) spezifische Gene und das 23S rRNA-Gen, welches bei allen *Campylobacter spp.* vorhanden ist, nachgewiesen (Tabelle 2).

Der PCR Mastermix setzte sich aus Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelten Wasser (Sigma Aldrich Corp.), 10 x PCR Puffer (-MgCl₂) (Thermo Fisher Scientific Inc.), MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc.), dNTP's (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc.), Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) und spezifischen Primern (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) zusammen (Tabelle 3).

Tabelle 2: *Campylobacter*-Primer für die Speziesbestimmung.

Primer	Sequenz (5'-3')	Spezies	Target	Fragmentgröße
CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i>	323 bp
CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC			
CCF	GTAAACCAAAGCTTATCGTG	<i>Campylobacter coli</i>	<i>glyA</i>	126 bp
CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG			
23SF	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG	<i>Campylobacter spp.</i>	23S rRNA Gen	650 bp
23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG			

Quelle: Wang et al., 2002.

Tabelle 3: Mastermix Zusammensetzung für die *Campylobacter* Multiplex-PCR.

Mastermix	finale Konz.		Grundkonz.		1x in μL
DEPC Wasser					13,4
10x PCR Puffer	1x				2,5
MgCl ₂	2	mM	50	mM	26
CJF (hipO)	500	nM	50000	nM	0,25
CJR (hipO)	500	nM	50000	nM	0,25
CCF (glyA)	1000	nM	50000	nM	0,5
CCR (glyA)	1000	nM	50000	nM	0,5
23SF	300	nM	50000	nM	0,15
23SR	300	nM	50000	nM	0,15
dNTP's	200	μM	5000	mM	1
Taq pol (Plat.)	01. Mai	U	5	U/ μl	0,3
Mastermix					20
Template					5
Reaktionsvolumen					25

Quelle: Wang et al., 2002.

Als Positivkontrollen dienten die Referenzstämme PC-CJ 24289 *C. jejuni* und PC-CC 24156 *C. coli*. Mit den zwei Negativkontrollen wurde einerseits die Kontamination des DNA-Extraktionsverfahrens ausgeschlossen (Leerkontrolle=LK), andererseits der kontaminationsfreie PCR-Ablauf (non-template control=NTC) überprüft.

Die Amplifikation der Spezies-spezifischen Target Gene erfolgte mit dem Bio-Rad Thermocycler (Bio-Rad Laboratories Inc.) (Tabelle 4).

Tabelle 4: PCR Konditionen.

PCR Zustand	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl von Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30sec	
Primerhybridisierung	59°C	30sec	30
Elongation	72°C	30sec	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlung	4°C	∞	

Quelle: Wang et al., 2002.

Die PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe der Gelelektrophorese auf 1,5% Agarosegel visualisiert. Dazu wurde 1,5 g peqGOLD Universal Agarose (Peqlab, Erlangen, Deutschland) in 100 ml 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) - Puffer (Sigma Aldrich Corp.) aufgelöst und in der Mikrowelle 3 min lang erhitzt. Nach der Abkühlung der Agaroselösung auf ca. 50°C wurde 2 µl PeqGreen Fluoreszenzfarbstoff (Peqlab) zugesetzt, um eine spätere DNA-Visualisierung unter UV-Licht zu ermöglichen. Als nächster Schritt wurde der Gelschlitten mit ein bis zwei Gelkämmen ausgestattet, mit dem Agarosegel aufgefüllt und ca. 30 min lang bei Raumtemperatur verfestigt. Anschließend wurde der Gelkamm vorsichtig entfernt und das Gel in die mit 1 x TAE Puffer (Sigma Aldrich Corp.) gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. In jede Geltasche wurde ein Gemisch bestehend aus 3 µl Ladepuffer (SLB; sample loading buffer) (Honeywell International Inc., Morris Plains, USA) und 10 µl PCR-Produkt pipettiert. Zur spätere Größenbestimmung von den DNA-Fragmenten wurde in die erste und in die letzte Geltasche je 100bp DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Laufzeit von 30 min bei einer Spannung von 120 V durchgeführt. Am Ende des Prozesses wurde das Gel mit Hilfe von GelDoc 2000 UV-Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc.) mit UV-Licht bestrahlt. Die im .tiff Format abgespeicherten Dateien wurden zur weiteren Dateninterpretation elektronisch am Server der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie archiviert.

2.4. PULS-FELD-GELELEKTROPHORESE (PFGE)

Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) gilt als „Goldstandard“ für die Bakterientypisierung. Aufgrund der Möglichkeit große DNA-Moleküle zu trennen (bis zu 10 Mbp), wird PFGE für die Analyse in verschiedenen mikrobiologischen Bereichen eingesetzt, wie z.B. für das Monitoring bakterieller Erreger während der Lebensmittelproduktion. Kontaminationsrouten können so leicht zu ihrem Ursprung rückverfolgt werden, oder auch der stetige Eintrag über bestimmte Vektoren identifiziert werden (NEOH et al., 2019).

Die Methode basiert auf dem Makrorestriktionsverdau der DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen (hier *Sma*I für *Campylobacter*; *Xba*I für *Salmonella*). Die dadurch entstehende DNA-Fragmente werden auf ein Agarosegel aufgetragen und unter wechselndem, pulsierendem elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt. Nach der Trennung den Fragmenten ergibt sich ein spezifisches Muster-ein DNA-Fingerabdruck, was die Untersuchung und den Vergleich der Verwandtschaft zwischen den Bakterienstämmen ermöglicht. Als Hilfsmarker zur späteren Auswertung der Fragmentgrößen wird der Marker *Salmonella braenderup* H9812 verwendet

(<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/Campylobacter-pfge-protocol-508c.pdf>;

<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>; eingesehen am: 23.09.2021).

Das PFGE-Verfahren kann in sechs Hauptschritte unterteilt werden:

1. Herstellung der Bakteriensuspension,
2. Herstellung der Agaroseblöckchen,
3. Lyse der Bakterienzellen,
4. DNA-Verdauung durch Restriktionsenzymen,
5. Gelelektrophorese und
6. Datenanalyse.

Die in der PFGE eingesetzten *Campylobacter* Isolate wurden unter mikroaerophilen Bedingungen bei 42°C 48 h lang auf Pferdeblutagar kultiviert. Zur Herstellung einer Bakteriensuspension wurde Koloniematerial in 3 ml 1 x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) pH 7,4 (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.0018 M KH₂PO₄) suspendiert, gründlich gevortext und eine endgültige optische Dichte (OD_{610nm}) von 0,68 mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland) eingestellt. Im nächsten Schritt wurde 0,25 g SeaKem Gold® Agarose (Lonza Group AG, Basel, Schweiz) in 25 ml 10 x TE (Tris-EDTA) Puffer (Sigma Aldrich Corp.) mit einem pH-Wert von 8 (1 M Tris HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8) aufgelöst und in der Mikrowelle so lange erhitzt (4 min), bis sich die Agarose komplett aufgelöst hat. Bis zur weiteren Verwendung wurde die geschmolzene Agarose abgedeckt in ein Wasserbad gestellt und bei 56°C temperiert. Zu jeder Zellsuspension wurden 20 µl Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH, Wien, Österreich) zugegeben und vorsichtig gevortext. Zur Herstellung der Agaroseblöckchen wurde 400 µl 1% Agarose in jede Suspension zugegeben, durch dreimal auf- und abpipettieren gemischt und ohne Blasenbildung vorsichtig in die Gießform gefüllt. Es wurden pro Isolat je fünf Agaroseblöckchen hergestellt. Die Abkühlung und Verfestigung von den Agaroseblöckchen fand bei Raumtemperatur nach 20 min statt. Nach dem Verfestigen wurden die Agaroseblöckchen in 5 ml Zelllysispuffer (1 M Tris HCl pH 8, 0,5 M EDTA pH 8.0 und Lauroylsarcosine) (Sigma Aldrich Corp.) überführt und über Nacht bei 54°C im Wasserbad mit Schüttelfunktion (120 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Agaroseblöckchen zwei Mal mit 54°C temperierten Aqua bidest. (B Braun Melsungen AG, Deutschland) und danach drei Mal mit 54°C temperierten 10 x TE Puffer (eingestellt bei pH 8) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurden die Agaroseblöckchen im 54°C Wasserbad für je 10 min

schüttelnd (120 rpm) inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Agaroseblöckchen in sterile 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG) überführt, mit 10 x TE Puffer (pH 8) aufgefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Gleichzeitig wurden auch die Agaroseblöckchen für den Referenzmarker *Salmonella braenderup* H9812 hergestellt. Im ersten Schritt wurde das Cryoisolat auf TSAY Platte ausgestrichen und 24 h lang bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension und die Agaroseblöckchen von dem *Salmonella*-Isolat wurden mit der gleichen Methode, wie die der *Campylobacter* Isolate hergestellt (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/Campylobacter-pfge-protocol-508c.pdf>; eingesehen am: 23.09.2021).

Zum DNA-Verdau der *Campylobacter* Isolate und *Salmonella* Marker wurde das Restriktionsenzym *Sma*I und *Xba*I (Thermo Fisher Scientific Inc., Fermentas) verwendet. Im ersten Schritt wurde von jedem Agaroseblöckchen ein Viertel Blöckchen mit einem Skalpell abgeschnitten und dieses in 100 µl Vor-Verdauung-Gemisch bestehend aus 10 µl Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 90 µl DEPC Wasser für 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach 10 min wurde das Vor-Verdauung-Gemisch aus den Eppendorf-Röhrchen vorsichtig ohne die Agaroseblöckchen zu beschädigen abpipettiert und mit 100 µl Restriktionspuffer Gemisch aufgefüllt. Das verwendete Restriktionspuffer-Gemisch für den *Campylobacter*-Zellverdau wurde aus 0,4 µl *Sma*I Enzym, 10 µl Tango Puffer und 89,6 µl sterilem Wasser hergestellt. Beim *Salmonella* Zellverdau wurden 0,5 µl *Xba*I Restriktionsenzym unter Zugabe von 10 µl Tango Puffer mit 89,5 µl sterilem Wasser equilibriert. Die *Campylobacter*- und *Salmonella* Agaroseblöckchen wurden 4 h lang bei 25°C und 37°C im jeweiligem Restriktionspuffer-Gemisch inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Enzym-Puffer-Gemisch aus den Eppendorf-Röhrchen entfernt und jedes Blöckchen 10 min lang bei Raumtemperatur in 100 µl 0,5 x TBE (Tris-Borsäure EDTA) Puffer equilibriert. In nächstem Schritt wurden die Agaroseblöckchen auf dem Gelkamm vorsichtig aufgetragen und in 1% Agarosegel (1,5 g SeaKem Gold Agarose, 150 ml 0,5 x TBE Puffer) getaucht. Das Gel wurde bei Raumtemperatur für 30 min lang ausgehärtet. Nach dem Verfestigen wurde der Gelkamm vorsichtig entfernt und das Agarosegel wurde in eine mit 2200 ml 0,5 x TBE Puffer gefüllte PFGE-Elektrophoresekammer (Bio-Rad Inc.) gelegt. Die Elektrophorese-Laufzeit betrug 22,5 h bei 14°C mit einer anfänglicher Schaltzeit von 5 sec, abschließender Schaltzeit von 55 sec, Spannung von 6 V/cm und inkludiertem Winkel von 120°.

Nach dem Abschluss des Elektrophorese-Laufes wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (50 µl Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, Merck KGaA) in 500 ml sterilem Wasser gelöst) für 30 min gefärbt und

mit UV-Licht bestrahlt (GelDoc 2000 UV-Imaging System). Die erzeugten Bandmuster wurden mit dem Programm GelDoc 2000 digital abfotografiert und im .tiff Format am Server gespeichert.

3. RESULTATE

In dem ersten diagnostischen Schritt wurden die *Campylobacter* Isolate mittels PCR-Methode bestätigt. Von insgesamt 166 vorliegenden Isolaten 92,8 % (n=154) wurde als *C. jejuni* und 7,2 % (n=12) als *C. coli* identifiziert.

C. jejuni war die dominante Art mit n=154 bestätigten Isolaten in 16 Herden mit folgendem Verteilungsmuster in den Schlachthöfen: *C. jejuni* und *C. coli* bei 87 (52.41%), 25 (15.06 %) und 22 (13.25%) Isolaten assoziiert zu Schlachthof C, B und D und nur *C. jejuni* bei 20 (12.05%) und 12 (7.23%) Isolaten assoziiert zu Schlachthof E und A (Tabelle 5). *C. jejuni* und *C. coli* Mischpopulationen wurden in Darmkonvolutproben von drei Betrieben (B1, C3, D1) bestätigt, während in B2 ausschließlich *C. coli* nachgewiesen wurde. In Darmkonvolutproben (n=145) wurde sowohl *C. jejuni* (n=133; 91,7%) als auch *C. coli* (n=12; 8,3%) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu waren in den Halshautproben nur *C. jejuni* (n=20; 12,05%) Isolate vorhanden. Das Tränkewasserisolat aus Mastbetrieb C2 wurde als *C. jejuni* bestätigt (Tabelle 5 & Abbildung 2).

Tabelle 5: *Campylobacter* Isolatset und Spezies zugeordnet zu den Broilerbetrieben und zugehörigen Schlachthöfen.

Schlachthof	Mastbetrieb	<i>Campylobacter</i> Isolate		Darmkonvolut				Halshaut		Wasser-Tupfer	
		(n)	%	<i>C. jejuni</i> (n)	%	<i>C. coli</i> (n)	%	<i>C. jejuni</i> (n)		<i>C. jejuni</i> (n)	%
A	A1	8	4.82	8	4.82	0	0.00	0	0.00	0	0.00
A	A2	4	2.41	3	1.81	0	0.00	1	0.60	0	0.00
B	B1	8	4.82	2	1.20	5	3.01	1	0.60	0	0.00
B	B2	1	0.60	0	0.00	1	0.60	0	0.00	0	0.00
B	B3	7	4.22	6	3.61	0	0.00	1	0.60	0	0.00
B	B4	5	3.01	3	1.81	0	0.00	2	1.20	0	0.00
B	B5	4	2.41	4	2.41	0	0.00	0	0.00	0	0.00
C	C1	14	8.43	11	6.63	0	0.00	3	1.81	0	0.00
C	C2	8	4.82	5	3.01	0	0.00	2	1.20	1	0.60
C	C3	26	15.66	22	13.25	1	0.60	3	1.81	0	0.00
C	C4	39	23.49	36	21.69	0	0.00	3	1.81	0	0.00
D	D1	9	5.42	2	1.20	5	3.01	2	1.20	0	0.00
D	D2	13	7.83	12	7.23	0	0.00	1	0.60	0	0.00
E	E1	9	5.42	8	4.82	0	0.00	1	0.60	0	0.00
E	E2	8	4.82	8	4.82	0	0.00	0	0.00	0	0.00
E	E3	3	1.81	3	1.81	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total	16	166		145 (87,35%)				20 (12,05%)		1 (0,60%)	

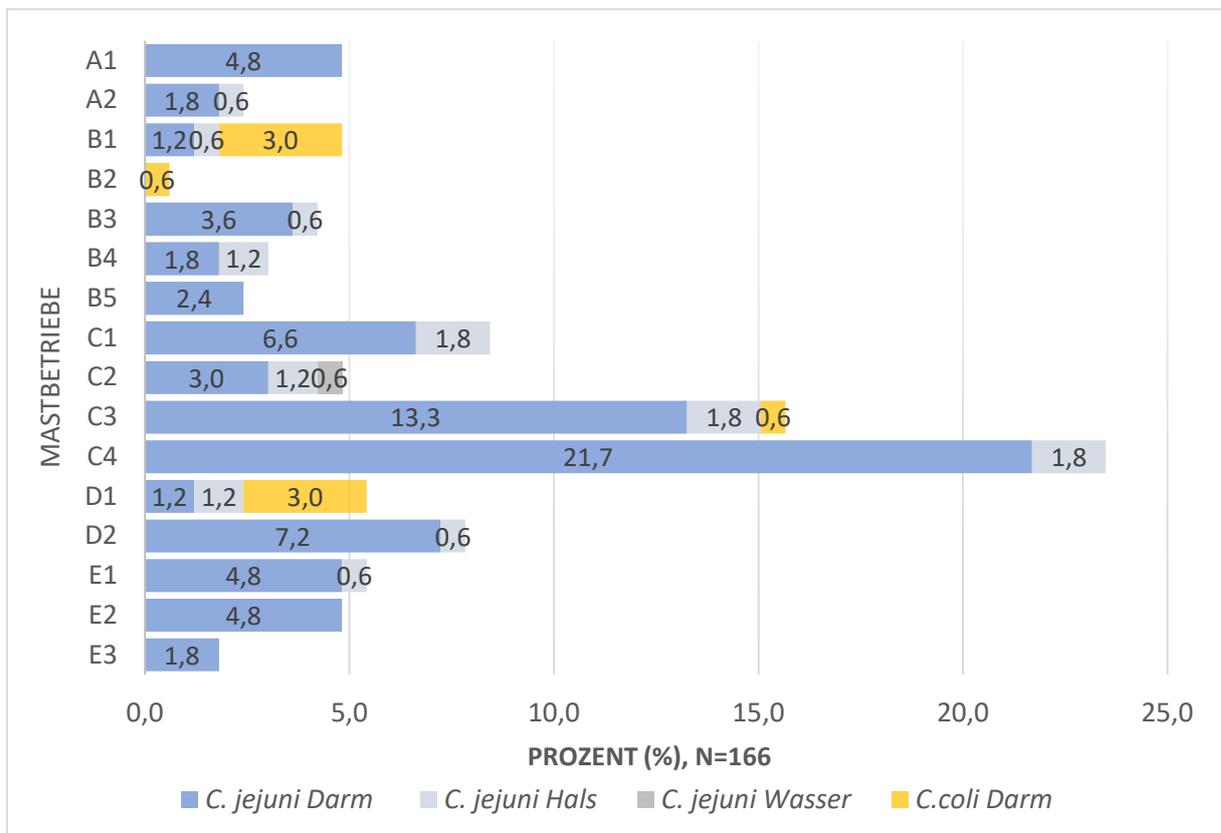


Abbildung 2: Prozentuelle Verteilung von *Campylobacter* Spezies isoliert aus Darm-, Halshaut- und einer Wasserprobe assoziiert zu verschiedenen Broilerbetrieben und Schlachthöfen (n=166 Isolate).

Die meisten *C. jejuni* Darmisolate wurden in Betrieb C4 (21.7%), C3 (13.3%) und D2 (7.2%) isoliert (Abbildung 2). Die PFGE-Typisierung ergab 26 *C. jejuni* und vier *C. coli* Genotypen (Restriktionsenzym *Sma*I). In der Mehrzahl der Betriebe (n=12; 75%) wurden zugleich mehrere *Campylobacter* PFGE Typen detektiert, nur in vier Mastfarmen (A2, B2, B3, E3) wurde jeweils ein einzelner Genotyp isoliert (Abbildung 3, Tabelle 6). Obwohl der PFGE Typ CJE 4 und CJE 8 in den Mastbetrieben A2 und B3 alleine isoliert wurde, kam er zeitgleich in anderen Mastbetrieben vor (CJE 4 in E2 und CJE 8 in C1).

Die meisten *C. jejuni* Genotypen waren in den Mastbetrieben C3 und C4 mit je 6 bzw. 9 verschiedenen PFGE-Typen vorhanden. In folgenden Mastbetrieben wurden stallspezifische PFGE-Typen isoliert: B1, B5, C2, C3, C4, D1, D2, E2 und E3. Interessanterweise wurden 13 *C. jejuni* Genotypen (CJE 1, CJE 2, CJE 3, CJE 4, CJE 5, CJE 8, CJE 9, CJE 10, CJE 15, CJE 17, CJE 18, CJE 20, CJE 21) in mehreren Betrieben nachgewiesen. Am häufigsten traten die PFGE Typen CJE 1, CJE 2, CJE 5, CJE 9 und CJE 10 auf (Abbildung 3, Tabelle 6). Die *C. coli* Genotypen waren jeweils in vier Mastbetrieben detektiert worden, wobei CCO 3 ohne weitere *C. jejuni* Genotypen in Mastbetrieb B2 präsent war (Tabelle 6).

Bei 11 Mastbetrieben wurden die Halshautproben nach dem Schlachtprozess untersucht. Im Gegensatz zu den Darmkonvolutproben wurde ausschließlich *C. jejuni* isoliert (Tabelle 6).

Die größte Genotypen-Diversität war in Halshautproben von Mastbetrieb C3 (n=3), gefolgt von Mastbetrieb C1, C2 und C4 (n=2) zu sehen.

Die *C. jejuni* Diversität an Halshautproben war geringer ausgeprägt im Vergleich zu den Darmkonvoluten. PFGE-Typen (n=12) von folgenden Mastbetrieben die schon in Darmkonvoluten identifiziert wurden, konnten auf Halshautproben wiedergefunden werden: A2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, D1 und D2 (Abbildung 7). Der Genotyp *C. jejuni* CJE 12 war nur in einer Halshautprobe von Betrieb C2 nachweisbar, was auf eine Kreuzkontamination von einer anderen Herde während der Schlachtung hinweist. Eine globalere Verbreitung einzelner *C. jejuni* Genotypen war bei CJE 1 zu beobachten, der initial bei Mastbetrieb A1, B5 und C1 isoliert wurde, dann in Halshautproben von B1 und C1 anzutreffen war. CJE 2 war ursprünglich im Darmkonvolut von A1 präsent, dann in Halshautproben von Betrieb C1. Dieselbe Beobachtung erfolgte für CJE 10, der in Darmkonvoluten von Mastbetrieb B4 und E1, dann auch auf Halshaut von C4 identifiziert wurde.

Das Isolat aus dem Tupfer der Tränkwasserlinie CJE 10 wurde in Betrieb C2, in Darmkonvolut von B4 und Darmkonvolut und Halshaut von Mastbetrieb E1 detektiert. Dies deutet auf eine weitere Verbreitung bestimmter *C. jejuni* Genotypen hin.

Abbildung 3: *Campylobacter jejuni* Genotypen und ihr Vorkommen in Mastbetrieben.

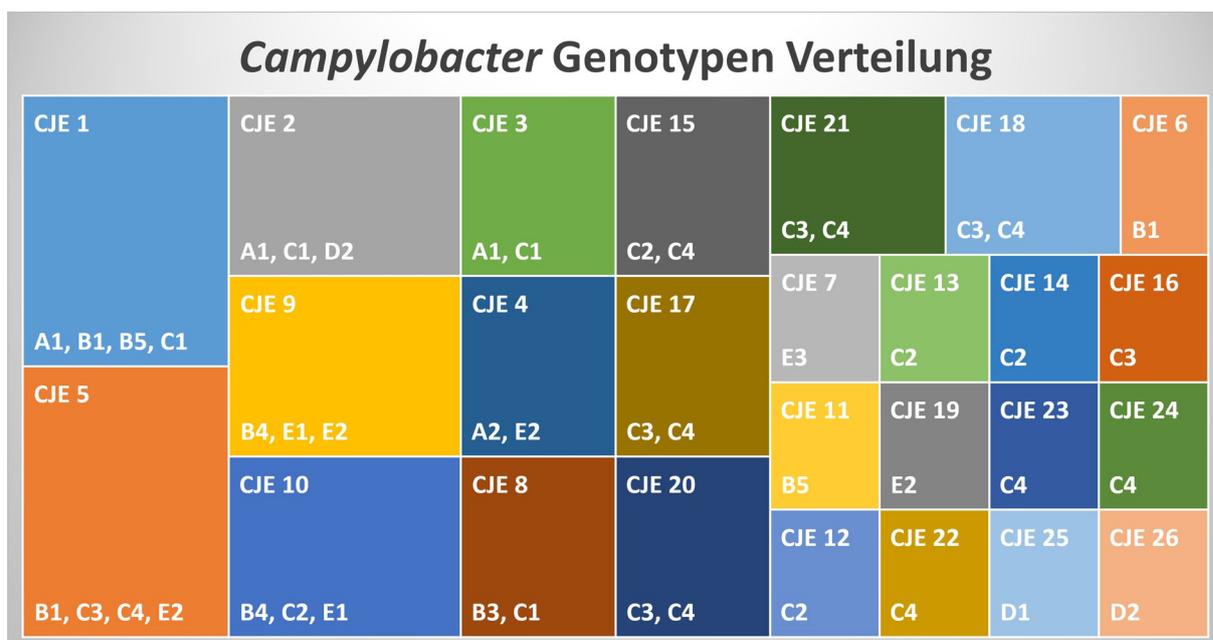
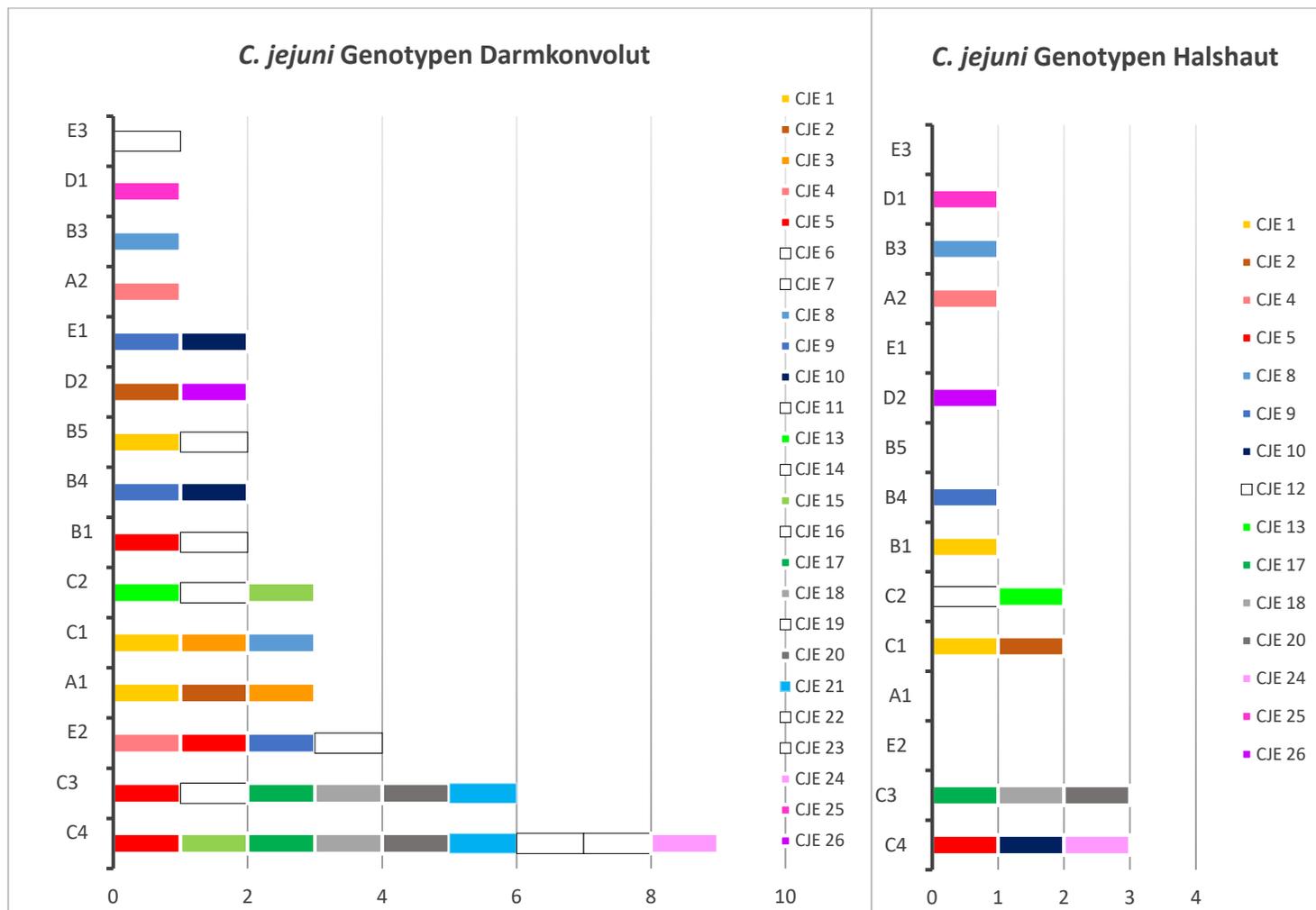


Tabelle 6: Genetische Diversität von *Campylobacter* basierend auf PFGE-Profilen.

BETRIEB	DARMKONVOLUT			HALSHAUT		W-TUPFER	GENOTYPEN (n)			
	<i>C. jejuni</i>			<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
A1	CJE 1	CJE 2	CJE 3				3	3	0	
A2	CJE 4				CJE 4		1	1	0	
B1	CJE 5	CJE 6		CCO 1	CJE 1		4	3	1	
B2				CCO 3			1	0	1	
B3	CJE 8				CJE 8		1	1	0	
B4	CJE 9	CJE 10			CJE 9		2	2	0	
B5	CJE 1	CJE 11					2	2	0	
C1	CJE 8	CJE 1	CJE 3		CJE 1	CJE 2	4	4	0	
C2	CJE 13	CJE 14	CJE 15		CJE 12	CJE 13	CJE 10	6	6	0
C3	CJE 16	CJE 17	CJE 18	CCO 2	CJE 17	CJE 18				
	CJE 5	CJE 20	CJE 21		CJE 20			7	6	1
C4	CJE 17	CJE 5	CJE 18		CJE 5					
	CJE 20	CJE 21	CJE 22		CJE 24					
	CJE 24	CJE 23	CJE 15					9	9	0
D1	CJE 25			CCO 4	CJE 25		2	1	1	
D2	CJE 2	CJE 26			CJE 26		2	2	0	
E1	CJE 9	CJE 10			CJE 10		2	2	0	
E2	CJE 4	CJE 5	CJE 9				3	3	0	
	CJE 19						1	1		
E3	CJE 7						1	1		
16			25	4		15	1			

Abbildung 4: *Campylobacter jejuni* Genotypen Wiederfindung in Darmkonvolut und Halshaut.



Legende: Genotypen die durch eine schwarz umrandete Form gekennzeichnet sind, wurden nur einmal isoliert.

4. DISKUSSION und KONKLUSION

Im Jahr 2019 wurden insgesamt 220.682 *Campylobacter*-Fälle in der EU registriert, davon 6.573 in Österreich (EFSA & ECDC, 2021). Die Mehrzahl der *Campylobacter* Infektionen wird durch *C. jejuni* (83-90%) verursacht, wobei Geflügelfleisch den Hauptübertragungsweg darstellt. Ungefähr 5-10 % der Fälle sind mit *C. coli* assoziiert (BAALI et al., 2020; EFSA & ECDC, 2021). Nahezu 80 % aller Masthühnerherden innerhalb der EU sind mit *Campylobacter* infiziert, wobei unterschiedliche nationale Prävalenzen vorherrschen (PATUZZI et al., 2021).

Die Bekämpfung der *Campylobacter* erfordert eine mehrschichtige Interventionsstrategie. Das Ziel dieser Strategie ist die Prävalenz in der Primärproduktion zu reduzieren und die Kreuzkontamination während der Geflügelschlachtung möglichst gering zu halten (EFSA BIOHAZ, 2020). Da *Campylobacter* in verschiedenen Nischen des Betriebes und im Umfeld auftreten können (Boden, Einstreu, Futter, Stallumgebung, Wasser) ist es leicht die Erreger in den Stall einzuschleppen (KITTLER et al., 2021).

In dieser Studie haben wir uns auf die Diversität von *Campylobacter* im Darmtrakt von Masthühnern und auf korrespondierenden Halshautproben konzentriert. Der Vergleich diente einer Abschätzung von präsenteren Genotypen in mehreren Mastbetrieben und der Verfolgung von Kreuzkontaminationen während der Schlachtung. Die Wiederfindung identer Genotypen auf der Halshaut, und entsprechenden Darmkonvolutproben von Mastbetrieben, lässt Rückschlüsse auf die Tenazität einzelner Typen zu. In dieser Studie war die Mehrheit der Isolate *C. jejuni* 92,8 % (n=154), der geringere Anteil *C. coli* 7,2 % (n=12). *C. coli* wurde ausschließlich in Darmkonvoluten von vier Mastbetrieben isoliert. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht. In einer Studie von Mendes et al. (2020) war *C. jejuni* die dominante Spezies in Mastbetrieb wie auch Schlachthof assoziierten Proben. Im Gegensatz zu unserer Studie (87.4% Isolate aus dem Darmtrakt), war die externe Kontamination der Broiler mit *Campylobacter* entlang der Verarbeitungskette ansteigend. Wir hatten die größte Genotypen Diversität in Darmkonvoluten von Mastbetrieb C3 und C4 mit je 6 und 9 verschiedenen PFGE-Typen beobachtet. Der größte Anteil von *C. jejuni* Isolaten wurde den Mastbetrieben C4 (23,5 %) und C3 (15.6%), alle durch den Schlachthof C verbunden, zugeordnet (Tabelle 5).

Campylobacter ist in unbehandeltem Wasser isolierbar, daher stellt auch das Tränkwasser im Mastbetrieb einen gewissen Risikofaktor dar (ROBYN et al., 2015; NASTASIJEVIC et al., 2020). Diese Tatsache reflektiert unser Ergebnis: in einer Wasserprobe von Mastbetrieb C2 wurde der Genotyp CJE 10 nachgewiesen. Dieser Genotyp war auch in Darmkonvolut von B4 und Darmkonvolut und Halshaut

von Mastbetrieb E1 detektiert. Dies deutet auf eine Verbreitung bestimmter *C. jejuni* Genotypen in mehreren geografischen Gebieten hin. Weitere in einem größeren Gebiet verbreitete Genotypen waren CJE 1, CJE 2 und CJE 10, die initial im Darmkonvolut bestimmter Mastbetriebe isoliert wurden und mit identen Genotypen auf der Halshaut in keinem epidemiologischen Zusammenhang, wie einer möglichen Kreuzkontamination im Schlachthof, standen (Tabelle 6; Abbildung 4). Andere *C. jejuni* PFGE-Typen (n=12), die schon in Darmkonvoluten von einzelnen Mastbetrieben identifiziert wurden, konnten auf entsprechenden Halshautproben wiedergefunden werden (Abbildung 7). Die Hypothese, dass *Campylobacter* isoliert von Nackenhaut nicht ident mit den Genotypen präsent in Darmkonvolutproben ist, war daher nur partiell richtig.

Aus der Umwelt können die Erreger über Stiefel, Kleidung, Ausrüstung, landwirtschaftliche Fahrzeuge des Landwirtes oder externen Personals in den Stall eingeschleust werden (ROBYN et al., 2015). In vielen Ländern wird eine partielle Bestandsausdünnung durchgeführt, wobei 1/4 bis 1/3 der Herde ausselektiert wird (RASSCHAERT et al., 2020). Der Ausdünnungsprozess der Tiere erfordert das Eindringen des externen Fangteams und der Fanggeräte in den abgeschirmten Stallbereich, womit das Übertragungsrisiko von *Campylobacter* spp. zwischen den einzelnen Beständen und den Schlachthöfen signifikant erhöht wird (LU et al., 2021). Mehrere Studien haben gezeigt, dass 60 – 90 % der Transportkisten trotz der Reinigung und Desinfektion mit *Campylobacter* kontaminiert waren und die Erreger von mehr als 50 % der Fänger- und Fahrerstiefel und von LKW-Rädern isoliert wurden (ROBYN et al., 2015; RASSCHAERT et al., 2020). Neben der Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern während des Ausdünnungsprozesses und während der Fahrt auf den Schlachthof ist bekannt, dass diese Manipulationen auch immensen Stress für die Tiere bedeuten (HERTOGS et al., 2021). Es ist nachgewiesen, dass der Stress die Immunität des Wirtes vermindert und die Anfälligkeit für die Kolonisation mit dem Erreger steigert. Durch vermehrte Freisetzung von Noradrenalin wird die Wachstumsrate, Motilität und die Invasion von *Campylobacter* im Magen-Darm-Trakt angeregt, was zu einer vermehrten Ausscheidung des Erregers führen kann (HERTOGS et al., 2021). Während des Transportes an den Schlachthof können sogar Tiere von negativ getesteten Herden kreuzkontaminiert werden (ROBYN et al., 2015). Den nächsten Risikobereich für eine Kreuzkontamination der Broiler stellt die Schlachthofumgebung dar (TANG et al., 2020). Die kritischen Punkte des Schlachtprozesses bilden die Phasen des Rupfens, der Darmentleerung, des Brühens und des Abspülens (RASSCHAERT et al., 2020; LU et al., 2021). Der Genotyp *C. jejuni* CJE 12 war nur in einer Halshautprobe von Betrieb C2 nachweisbar, was auf eine Kreuzkontamination von einer anderen Herde während der Schlachtung hinweist. Laut den zitierten Studien sind *Campylobacter* trotz ihrer Hitzeempfindlichkeit in der Lage im

Brühwasser zu überleben. In 78 % der Brühwasserproben mit einer Kerntemperatur von 53°C wurde 3,6 log *Campylobacter* kolonienbildende Einheiten (KBE)/ml nachgewiesen (RASSCHAERT et al., 2020). Ein weiteres Problem stellt das Entfedern dar, wobei Hohlräume in der Hühnerhaut entstehen, in die Bakterien aus dem Brüh- und Spülwasser eindringen können und bei weiteren Prozessschritten geschützt werden (KITTLER et al., 2021). Schlachtchargen können außerdem durch die Ruptur der Eingeweide kontaminiert werden, oder durch nicht adäquates Schlachtequipment (SORO et al., 2020). Diese zwei angeführten Optionen wären eine mögliche Interpretation von unseren Halshautproben-Ergebnissen. Den PFGE-Typ CJE 1 haben wir in der Darmprobe von Mastbetrieb B5 nachgewiesen und in der Halshautprobe von Betrieb B1. Die Tiere von den beiden Betrieben wurden auf demselben Schlachthof B geschlachtet (Abbildung 4).

Die EFSA Risikobewertungen haben bestätigt, dass das von *Campylobacter spp.* ausgehende Risiko für die öffentliche Gesundheit um 50 % verringert werden könnte, wenn keine Charge den kritischen Grenzwert von 1000 KBE/g auf Hals- und Brusthaut überschreiten würde. Mit diesem Ziel trat das neue Prozesshygienekriterium für *Campylobacter* im Januar 2018 in Kraft. Trotz des Prozesshygienekriteriums wurde im Jahr 2019 von 3.346 Halshautproben von gekühlten Masthuhn-Schlachtkörpern 1.365 (41 %) positiv getestet. In 506 Fällen (15 %) wurde der Grenzwert überschritten (EFSA & ECDC, 2021). Diese Zahlen bestätigen die Tatsache, dass die Interventionsstrategien auf der Primärproduktionsebene unzureichend umgesetzt werden und weitere Basisdatenerhebungen zur Einhaltung der Biosicherheit benötigt werden.

Die größte Herausforderung bei der Verhinderung der *Campylobacter*-Kolonisierung von Broiler besteht darin, dass es innerhalb und zwischen den Erzeugern unterschiedliche Reservoirs und Übertragungswege gibt (FROSTH et al., 2020). Allgemein ist es sinnvoll Maßnahmen einzuhalten um die Besiedlung des Darmtraktes mit *Campylobacter spp.* zu verhindern. Unter diesen präventiven Maßnahmen gehört z.B.: die Trinkwasseraufbereitung mit Zusatz von organischer Säure, Futterergänzungsmittel (Bakteriozine, Bakteriophagen, Pflanzenextrakte, Pre- und Probiotika) und Biosicherheit auf der Farm (LU et al., 2021).

In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die Kontamination von negativ deklarierten Herden mit *Campylobacter spp.* während des Ausdünnungsprozesses rasch erfolgen kann (SIBANDA et al., 2018). Mehrere Autoren (ROBYN et al., 2015; RASSCHAERT et al., 2020; HERTOGS et al., 2021) haben in ihren Publikationen auf diese Fakten hingewiesen und haben dargestellt, was für eine wichtige Rolle in der Kontamination die Fangteams, Transportkisten und Fanggeräten erfüllen. Verbesserungsmöglichkeiten in diesem Bereich wären z.B. die effektive Reinigung und Desinfektion

von den Transportkisten nach dem Entladen, Desinfektionsmatten für die Ein- und Ausfahrtbereiche auf dem Betriebshof für die LKWs und sterile Kleidung und Schuhüberzug für die Fangteams (ALLEN et al., 2008; MILLMAN et al., 2017; WALES et al., 2019).

Darüber hinaus die wichtigste Strategie ist die Verringerung der Kreuz-Kontamination der Schlachtkörper mit *Campylobacter* (ROSSLER et al., 2020). Dieser Plan wird erschwert durch die Tatsache, dass *Campylobacter* gut an die lebensmittelverarbeitende Umgebung angepasst ist. Die hohe genetische Vielfalt und die zahlreichen Virulenzfaktoren begünstigen die Anpassung an die Nahrungskette (EMANOWITZ et al., 2021).

5. LITERATUR

- ABULREESH, H. H., ORGANJI, S. R., ELBANNA, K., OSMAN, G. E. H., ALMALKI, M. H. K., & AHMAD, I. (2017). *Campylobacter* in the environment: A major threat to public health. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(6), 374-384.
- ALLEN, V. M., WEAVER, H., RIDLEY, A. M., HARRIS, J. A., SHARMA, M., EMERY, J., SPARKS, N., LEWIS, M., & EDGE, S. (2008). Sources and spread of thermophilic *Campylobacter* spp. during partial depopulation of broiler chicken flocks. *Journal of food protection*, 71(2), 264-270.
- ATLAS, R. M. (2004). *Handbook of microbiological media*. CRC press.
- AWAD, W. A., HESS, C., & HESS, M. (2018). Re-thinking the chicken–*Campylobacter jejuni* interaction: a review. *Avian Pathology*, 47(4), 352-363.
- BAALI, M., LOUNIS, M., AL AMIR, H. L., AYACHI, A., HAKEM, A., & KASSAH-LAOUAR, A. (2020). Prevalence, seasonality, and antimicrobial resistance of thermotolerant *Campylobacter* isolated from broiler farms and slaughterhouses in East Algeria. *Veterinary World*, 13(6), 1221.
- BENETTI, T. M., ABRAHÃO, W. M., FERRO, I. D., MACEDO, R. E. F., & OLIVEIRA, T. C. R. M. (2016). Evaluation of the Direct and Enrichment Iso 10272 Methods for the Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Meat. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18, 23-28.
- BHAVSAR, S., & KAPADNIS, B. (2006). Virulence factors of *Campylobacter*. *Internet J. Microbiol*, 3(2), 1-7.
- BLESS, P. J., SCHMUTZ, C., & MÄUSEZAHL, D. (2017). The recurrent *Campylobacteriosis* epidemic over Christmas and New Year in European countries, 2006–2014. *BMC research notes*, 10(1), 1-7.
- BOLTON, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food microbiology*, 48, 99-108.
- BRANDIS, H., EGGERS, H. J., KÖHLER, W., & PULVERER, G. (EDS.). (1994). *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag.
- CARDOSO, M. J., FERREIRA, V., TRUNINGER, M., MAIA, R., & TEIXEIRA, P. (2021). Cross-contamination events of *Campylobacter* spp. in domestic kitchens associated with consumer handling practices of raw poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 338, 108984.
- CORRY, J. E., ATABAY, H. I., FORSYTHE, S. J., & MANSFIELD, L. P. (2003). Culture media for the isolation of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Arcobacter*. In *Progress in industrial microbiology* (Vol. 37, pp. 271-316). Elsevier.
- CURTIS, G. D. W., BAIRD, R. M., & CORRY, J. E. (Eds.). (2011). *Handbook of culture media for food and water microbiology*. Royal Society of Chemistry.
- DASTI, J. I., TAREEN, A. M., LUGERT, R., ZAUTNER, A. E., & GROß, U. (2010). *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(4), 205-211.
- ELLIS-IVERSEN, J., RIDLEY, A., MORRIS, V., SOWA, A., HARRIS, J., ATTERBURY, R., SPARKS, N., & ALLEN, V. (2012). Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. *Epidemiology & Infection*, 140(5), 916-924.

ELMI, A., NASHER, F., DORRELL, N., WREN, B., & GUNDOGDU, O. (2020). Revisiting *Campylobacter jejuni* virulence and fitness factors: role in sensing, adapting, and competing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10.

EMANOWICZ, M., MEADE, J., BOLTON, D., GOLDEN, O., GUTIERREZ, M., BYRNE, W., EGAN, J., LYNCH, H., O'CONNOR, L., COFFEY, A., LUCEY, B., & WHYTE, P. (2021). The impact of key processing stages and flock variables on the prevalence and levels of *Campylobacter* on broiler carcasses. *Food Microbiology*, 95, 103688.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012). Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for biological hazards to be covered by meat inspection of poultry. *EFSA Journal*, 10(6), 2764.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2020). Annual National Report Austria 2018; <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/zoocountryreport18at.pdf>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) & EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC) (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2), e06406

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), KOUTSOUMANIS, K., ALLENDE, A., ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., BOLTON, D., BOVER-CID, S., DAVIES, R., DE CESARE, A., HERMAN, L., HILBERT, F., LINDQVIST, R., NAUTA, M., PEIXE, L., RU, G., SIMMONS, M., SKANDAMIS, P., SUFFREDINI, E., ALTER, T., CROTTA, M., ELLIS-IVERSEN, J., HEMPEN, M., MESSENS, W., & CHEMALY, M. (2020). Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA Journal*, 18(4), e06090; <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2020.6090>

FITZGERALD, C., PATRICK, M., GONZALEZ, A., AKIN, J., POLAGE, C. R., WYMORE, K., GILLIM-ROSS, L., XAVIER, K., SADLOWSKI, J., MONAHAN, J., HURD, S., DAHLBERG, S., JERRIS, R., WATSON, R., SANTOVENIA, M., MITCHELL, D., HARRISON, C., TOBIN-D'ANGELO, M., DEMARTINO, M., PENTELLA, M., RAZEQ, J., LEONARD, C., JUNG, C., ACHONG-BOWE, R., EVANS, Y., JAIN, D., JUNI, B., LEANO, F., ROBINSON, T., SMITH, K., GITTELMAN, R. M., GARRIGAN, C., & NACHAMKIN, I. (2016). Multicenter evaluation of clinical diagnostic methods for detection and isolation of *Campylobacter* spp. from stool. *Journal of clinical microbiology*, 54(5), 1209-1215.

FROSTH, S., KARLSSON-LINDSJÖ, O., NIAZI, A., FERNSTRÖM, L. L., & HANSSON, I. (2020). Identification of transmission routes of *Campylobacter* and on-farm measures to reduce *Campylobacter* in chicken. *Pathogens*, 9(5), 363.

GARRITY, G. M., BELL, J. A., & LILBURN, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York.

GHARST, G., OYARZABAL, O. A., & HUSSAIN, S. K. (2013). Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of microbiological Methods*, 95(1), 84-92.

GRAVNING, G. E. N., RØTTERUD, O. J., BJØRKØY, S., FORSETH, M., SKJERVE, E., LLARENA, A. K., LIAN, A., JOHANNESSEN, G. S., & HAUGE, S. J. (2021). Comparison of four sampling methods for microbiological quantification on broiler carcasses. *Food Control*, 121, 107589.

GUERRY, P. (2007). *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in microbiology*, 15(10), 456-461.

HANSSON, I., PUDAS, N., HARBOM, B., & ENGVALL, E. O. (2010). Within-flock variations of *Campylobacter* loads in caeca and on carcasses from broilers. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 51-55.

HERMANS, D., VAN DEUN, K., MESSENS, W., MARTEL, A., VAN IMMERSEEL, F., HAESBROUCK, F., RASSCHAERT, G., HEYNDRIKX, M., & PASMANS, F. (2011). *Campylobacter* control in poultry by current intervention measures ineffective: urgent need for intensified fundamental research. *Veterinary microbiology*, 152(3-4), 219-228.

- HERTOGS, K., HEYNDRICKX, M., GELAUDE, P., DE ZUTTER, L., DEWULF, J., & RASSCHAERT, G. (2021). The effect of partial depopulation on *Campylobacter* introduction in broiler houses. *Poultry science*, 100(2), 1076-1082.
- HUTCHISON, M. L., TCHÓRZEWSKA, M. A., HARRISON, D., MADDEN, R. H., & CORRY, J. E. L. (2019). Consequences of using two types of skin samples from chilled chicken broiler carcasses to measure the degree of contamination by *Campylobacter* spp. *Journal of food protection*, 82(7), 1124-1129
- INDIKOVA, I., HUMPHREY, T. J., & HILBERT, F. (2015). Survival with a helping hand: *Campylobacter* and microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 1266.
- INGRESA-CAPACCIONI, S., GONZÁLEZ-BODÍ, S., JIMÉNEZ-TRIGOS, E., MARCO-JIMÉNEZ, F., CATALÁ, P., VEGA, S., & MARÍN, C. (2015). Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp. *Poultry science*, 94(4), 766-771.
- JIN, S., JOE, A., LYNETT, J., HANI, E. K., SHERMAN, P., & CHAN, V. L. (2001). JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Molecular microbiology*, 39(5), 1225-1236.
- JOHNSON, T. J., SHANK, J. M., & JOHNSON, J. G. (2017). Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Frontiers in microbiology*, 8, 487.
- JOSEFSEN, M. H., BHUNIA, A. K., ENGVALL, E. O., FACHMANN, M. S., & HOORFAR, J. (2015). Monitoring *Campylobacter* in the poultry production chain—From culture to genes and beyond. *Journal of microbiological methods*, 112, 118-125.
- KALISCHUK, L. D., & BURET, A. G. (2010). A role for *Campylobacter jejuni*-induced enteritis in inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(1), G1-G9.
- KIM, S. H., PARK, C., LEE, E. J., BANG, W. S., KIM, Y. J., & KIM, J. S. (2017). Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. *Food Control*, 71, 94-100.
- KITTLER, S., SHAKERI, G., PEH, E., & PLÖTZ, M. (2021). A One Health Perspective on a Multi-hurdle Approach to Combat *Campylobacter* spp. in Broiler Meat. *Current Clinical Microbiology Reports*, 1-13.
- KLEIN, G. (Ed.). (2016). *Campylobacter: features, detection, and prevention of foodborne disease*. Academic Press.
- KORMAN, T. M., VARLEY, C. C., & SPELMAN, D. W. (1997). Acute hepatitis associated with *Campylobacter jejuni* bacteraemia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16.9: 678-681.
- KOROLIK, V. (2019). The role of chemotaxis during *Campylobacter jejuni* colonisation and pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 47, 32-37.
- KOVALENKO, K., ROASTO, M., ŠANTARE, S., BĒRZIŅŠ, A., & HÖRMAN, A. (2014). *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. *Food control*, 46, 86-90.
- LAKE, I. R., COLON-GONZALEZ, F. J., TAKKINEN, J., ROSSI, M., SUDRE, B., DIAS, J. G., TAVOSCHI, L., JOSHI, A., SEMENZA, J. C., & NICHOLS, G. (2019). Exploring *Campylobacter* seasonality across Europe using the European surveillance system (TESSy), 2008 to 2016. *Eurosurveillance*, 24(13), 1800028

- LAMAS, A., REGAL, P., VÁZQUEZ, B., MIRANDA, J. M., CEPEDA, A., & FRANCO, C. M. (2018). Salmonella and *Campylobacter* biofilm formation: A comparative assessment from farm to fork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4014-4032.
- LERTSEHTAKARN, P., OTTEMANN, K. M., & HENDRIXSON, D. R. (2011). Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual review of microbiology*, 65.
- LIU, F., MA, R., WANG, Y., & ZHANG, L. (2018). The clinical importance of *Campylobacter concisus* and other human hosted *Campylobacter* species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 243.
- LU, T., MARMION, M., FERONE, M., WALL, P., & SCANNELL, A. G. (2021). On farm interventions to minimise *Campylobacter* spp. contamination in chicken. *British Poultry Science*, 62(1), 53-67.
- MALHER, X., SIMON, M., CHARNAY, V., DES DÉSERETS, R. D., LEHÉBEL, A., & BELLOC, C. (2011). Factors associated with carcass contamination by *Campylobacter* at slaughterhouse in cecal-carrier broilers. *International journal of food microbiology*, 150(1), 8-13.
- MELO, R. T., MENDONÇA, E. P., MONTEIRO, G. P., SIQUEIRA, M. C., PEREIRA, C. B., PERES, P. A., FERNANDEZ, H., & ROSSI, D. A. (2017). Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Frontiers in microbiology*, 8, 1332.
- MENDES, Â. J., SANTOS-FERREIRA, N. L., COSTA, F. M., LOPES, E. P., FREITAS-SILVA, J., INÁCIO, Â. S., MOREIRA, F., & MARTINS DA COSTA, P. (2020). External contamination of broilers by *Campylobacter* spp. increases from the farm to the slaughterhouse. *British poultry science*, 61(4), 400-407.
- MEUNIER, M., GUYARD-NICODÈME, M., DORY, D., & CHEMALY, M. (2016). Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1139-1173.
- MILLMAN, C., CHRISTLEY, R., RIGBY, D., DENNIS, D., O'BRIEN, S. J., & WILLIAMS, N. (2017). "Catch 22": Biosecurity awareness, interpretation and practice amongst poultry catchers. *Preventive veterinary medicine*, 141, 22-32.
- NASTASIJEVIC, I., PROSCIA, F., BOSKOVIC, M., GLISIC, M., BLAGOJEVIC, B., SORGENTONE, S., KIRBIS, A., & FERRI, M. (2020). The European Union control strategy for *Campylobacter* spp. in the broiler meat chain. *Journal of Food Safety*, 40(5), e12819.
- NEOH, H. M., TAN, X. E., SAPRI, H. F., & TAN, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103935.
- OH, E., MCMULLEN, L. M., CHUI, L., & JEON, B. (2017). Differential survival of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* under different gas conditions. *Frontiers in microbiology*, 8, 954.
- OLIVER, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, 43(spc1), 93-100.
- PARK, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 74(3), 177-188.
- PATUZZI, I., ORSINI, M., CIBIN, V., PETRIN, S., MASTRORILLI, E., TIENGO, A., GOBBO, F., CATANIA, S., BARCO, L., RICCI, A., & LOSASSO, C. (2021). The Interplay between *Campylobacter* and the Caecal Microbial Community of Commercial Broiler Chickens over Time. *Microorganisms*, 9(2), 221

- PEREZ-ARNEDO, I., CANTALEJO, M. J., MARTÍNEZ-LAORDEN, A., & GONZALEZ-FANDOS, E. (2021). Effect of processing on the microbiological quality and safety of chicken carcasses at slaughterhouse. *International Journal of food science & Technology*, 56(4), 1855-1864.
- POPE, J. E., KRIZOVA, A., GARG, A. X., THIESSEN-PHILBROOK, H., & OUIOMET, J. M. (2007). *Campylobacter* reactive arthritis: a systematic review. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 37, No. 1, pp. 48-55). WB Saunders.
- RAMAMURTHY, T., GHOSH, A., PAZHANI, G. P., & SHINODA, S. (2014). Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health*, 2, 103.
- RAMIRES, T., DE OLIVEIRA, M. G., KLEINUBING, N. R., DE FÁTIMA RAUBER WÜRFEL, S., MATA, M. M., IGLESIAS, M. A., VOLZ LOPES, G., DELLAGOSTIN, O. A., & DA SILVA, W. P. (2020). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of thermophilic *Campylobacter* isolated from broiler production chain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-12.
- RASSCHAERT, G., DE ZUTTER, L., HERMAN, L., & HEYNDRIKX, M. (2020). *Campylobacter* contamination of broilers: The role of transport and slaughterhouse. *International journal of food microbiology*, 322, 108564.
- REICH, F., VALERO, A., SCHILL, F., BUNGENSTOCK, L., & KLEIN, G. (2018). Characterisation of *Campylobacter* contamination in broilers and assessment of microbiological criteria for the pathogen in broiler slaughterhouses. *Food Control*, 87, 60-69.
- REUTER, M., MALLETT, A., PEARSON, B. M., & VAN VLIET, A. H. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), 2122-2128.
- RICHTLINIE 2003/99/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=CELEX%3A32003L0099>.
- ROBINSON, D. A., EDGAR, W. J., GIBSON, G. L., MATCHETT, A. A., & ROBERTSON, L. (1979). *Campylobacter* enteritis associated with consumption of unpasteurised milk. *Br Med J*, 1(6172), 1171-1173.
- ROBYN, J., RASSCHAERT, G., PASMANS, F., & HEYNDRIKX, M. (2015). Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: risk factors and intervention. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 81-105.
- ROLLINS, D. M., & COLWELL, R. R. (1986). Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and environmental microbiology*, 52(3), 531-538.
- ROSSLER, E., OLIVERO, C., SOTO, L. P., FRIZZO, L. S., ZIMMERMANN, J., ROSMINI, M. R., SEQUEIRA, G. J., SIGNORINI, M. L., & ZBRUN, M. V. (2020). Prevalence, genotypic diversity and detection of virulence genes in thermotolerant *Campylobacter* at different stages of the poultry meat supply chain. *International journal of food microbiology*, 326, 108641.
- SAKARIDIS, I., ELLIS, R. J., CAWTHRAW, S. A., VAN VLIET, A. H., STEKEL, D. J., PENELL, J., CHAMBERS, M., LA RAGIONE, R. M., & COOK, A. J. (2018). Investigating the association between the caecal microbiomes of broilers and *Campylobacter* burden. *Frontiers in microbiology*, 9, 927.
- SAMPERS, I., BERKVEN, D., JACXSENS, L., CIOCCI, M. C., DUMOULIN, A., & UYTENDAELE, M. (2012). Survey of Belgian consumption patterns and consumer behaviour of poultry meat to provide insight in risk factors for *Campylobacteriosis*. *Food Control*, 26(2), 293-299.

SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., MAHON, B. E., JONES, T. F., & GRIFFIN, P. M. (2015). An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology & Infection*, 143(13), 2795-2804.

SELBITZ, H. J., TRUYEN, U., & VALENTIN-WEIGAND, P. (Eds.). (2015). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Georg Thieme Verlag.

SHEPPARD, S. K., DALLAS, J. F., STRACHAN, N. J., MACRAE, M., MCCARTHY, N. D., WILSON, D. J., GORMLEY, F. J., FALUSH, D., OGDEN, I. D., MAIDEN, M. C. J., & FORBES, K. J. (2009). *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, 48(8), 1072-1078.

SIBANDA, N., MCKENNA, A., RICHMOND, A., RICKE, S. C., CALLAWAY, T., STRATAKOS, A. C., GUNDOGDU, O., & CORCIONIVOSCHI, N. (2018). A review of the effect of management practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms. *Frontiers in microbiology*, 9, 2002.

SILVA, J., LEITE, D., FERNANDES, M., MENA, C., GIBBS, P. A., & TEIXEIRA, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in microbiology*, 2, 200.

SKARP, C. P. A., HÄNNINEN, M. L., & RAUTELIN, H. I. K. (2016). *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103-109.

SORO, A. B., WHYTE, P., BOLTON, D. J., & TIWARI, B. K. (2020). Strategies and novel technologies to control *Campylobacter* in the poultry chain: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1353-1377.

SZYMANSKI, C. M., KING, M., HAARDT, M., & ARMSTRONG, G. D. (1995). *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and immunity*, 63(11), 4295-4300.

TANG, Y., JIANG, Q., TANG, H., WANG, Z., YIN, Y., REN, F., KONG, L., JIAO, X., & HUANG, J. (2020). Characterization and prevalence of *Campylobacter* spp. from broiler chicken rearing period to the slaughtering process in eastern China. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 227.

TANGWATCHARIN, P., CHANTHACHUM, S., KHOPAIBOOL, P., & GRIFFITHS, M. W. (2006). Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *Journal of food protection*, 69(11), 2747-2753.

TANIGUCHI, T., OHKI, M., URATA, A., OHSHIRO, S., TARIGAN, E., KIATSOMPHOB, S., VETCHAPITAK, T., SATO, H., & MISAWA, N. (2021). Detection and identification of adhesins involved in adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108929.

UGARTE-RUIZ, M., GÓMEZ-BARRERO, S., PORRERO, M. C., ALVAREZ, J., GARCIA, M., COMERON, M. C., WASSENAAR, T. M., & DOMINGUEZ, L. (2012). Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices. *Journal of applied microbiology*, 113(1), 200-208.

VERORDNUNG (EU) 2017/1495 DER KOMMISSION; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32017R1495>

WALES, A. D., VIDAL, A. B., DAVIES, R. H., & RODGERS, J. D. (2019). Field interventions against colonization of broilers by *Campylobacter*. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(1), 167-188

WALKER, R. I., CALDWELL, M. B., LEE, E. C., GUERRY, P., TRUST, T. J., & RUIZ-PALACIOS, G. M. (1986). Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiological reviews*, 50(1), 81.

WASSENAAR, T. M. (1997). Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 466-476.

WASSENAAR, T. M., & NEWELL, D. G. (2006). The genus *Campylobacter*. *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*, 7, 119-138.

WILLIAMS, M. S., GOLDEN, N. J., EBEL, E. D., CRAREY, E. T., & TATE, H. P. (2015). Temporal patterns of *Campylobacter* contamination on chicken and their relationship to *Campylobacteriosis* cases in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 114-121.

ZAGHLOUL, M. Z., FAROUK, N. & GALAL, Z. A. (2012). Detection of *Campylobacter* spp. in stool samples by new methods in comparison to culture. *Life Sci J*, 9(4), 2566-2571.

6. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes des Österreichischen Kompetenzzentrums für Futter- und Lebensmittelqualität, -sicherheit und -innovation (FFoQSI) erstellt. Das COMET-K1 Kompetenzzentrum FFoQSI wird vom österreichischen Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie (BMVIT), dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMDW) und den Bundesländern Niederösterreich, Oberösterreich und Wien im Rahmen von COMET - Competence Centers for Exzellente Technologien gefördert. Die Leitung des COMET-Programms liegt bei der FFG. Der Non-K-Bereich liegt außerhalb des in COMET geförderten Forschungsprogramms eines Zentrums und umfasst Drittmittelprojekte des Zentrums aus Unternehmensaufträgen, nationalen wissenschaftlichen Fonds und internationalen F&E-Programmen (insb. EU-Programmen).

7. EXTENDED SUMMARY

Campylobacter is one of the most important foodborne pathogens in the world. The main route of transmission is through food, especially inadequately heated poultry meat. Although symptoms are usually self-limiting, complications can be severe and even fatal without treatment.

Campylobacteriosis control is based on multi-layered intervention strategy, aiming to reduce prevalence at the primary production level and minimize cross-contamination. The effectiveness of the specific prevention measures at the farm level, *Campylobacter* status from broiler flocks, and carcass contamination are monitored through sampling methods. For detection of *Campylobacter* in broiler flocks and for confirmation of *Campylobacter* contamination of carcasses, appendix and neck skin samples are collected after the slaughter process.

This study was conducted to elicit the potential genetic diversity of *Campylobacter* isolates (n=166) from gut and neck skin samples from 16 broiler poultry farms and their associated slaughterhouses (n=5).

We confirmed the *Campylobacter* isolates obtained by multiplex PCR method. *C. jejuni* was the dominant species (n=154; 92.8%), and *C. coli* was detected in only n=12 (7.2%) isolates. PFGE subtyping revealed 26 *C. jejuni* and four *C. coli* genotypes. Multiple *Campylobacter* genotypes were detected simultaneously in n=12 (75%) farms. In contrast to intestinal convoluted samples (both species

detected), only *C. jejuni* isolates were confirmed in neck skin samples. CJE 1, CJE 2, CJE 5, CJE 9, and CJE 10 genotypes occurred in several farms and slaughterhouses, indicating global distribution.

The results of the study allow the potential pathways of spread between individual farms and slaughterhouses of different genotypes to be identified, help confirm cross-contamination of carcasses, and support the improvement of prevention measures at the primary production level.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Campylobacter ist einer der wichtigsten lebensmittelbedingten Krankheitserreger auf der Welt. Der Hauptübertragungsweg findet über die Nahrung, vor allem über nicht ausreichend erhitztes Geflügelfleisch statt. Obwohl die Symptome meistens selbstlimitierend sind, können die Komplikationen schwerwiegend sein und ohne Behandlung sogar fatal enden.

Die Bekämpfung der Campylobacteriose basiert auf mehrschichtiger Interventionsstrategie, mit dem Ziel die Prävalenz auf der Primärproduktionsebene zu reduzieren und die Kreuzkontamination zu minimieren. Die Wirksamkeit der bestimmten Präventionsmaßnahmen auf Betriebsebene, der *Campylobacter*-Status von den Broilerherden und die Kontamination von Schlachtkörpern wird durch Probenahmeverfahren überwacht. Für den Nachweis von *Campylobacter* in Mastbetrieben und für Bestätigung der Kontamination von Schlachtkörpern mit *Campylobacter* werden Blinddarm- und Halshautproben nach dem Schlachtprozesses entnommen.

Diese Studie wurde durchgeführt, um die potentielle genetische Vielfalt der *Campylobacter* Isolate (n=166) aus Darmkonvolut- und Halshautproben von 16 Mastgeflügelbetrieben und den zugehörigen Schlachthöfen (n=5) zu eruieren.

Wir haben die erhaltenen *Campylobacter*-Isolate mittels Multiplex-PCR Methode bestätigt. *C. jejuni* war die dominante Spezies (n=154; 92,8%), *C. coli* wurde nur in n=12 (7,2%) Isolaten nachgewiesen. Die PFGE-Subtypisierung ergab 26 *C. jejuni* und vier *C. coli* Genotypen. In n=12 (75%) Betrieben wurden zugleich mehrere *Campylobacter* Genotypen detektiert. Im Gegensatz zu Darmkonvolutproben (beide Spezies nachgewiesen), wurden in Halshautproben nur *C. jejuni* Isolate bestätigt. In mehreren Betrieben und Schlachthöfen traten die Genotypen CJE 1, CJE 2, CJE 5, CJE 9 und CJE 10 auf, was auf eine globale Verbreitung hinweist.

Die Resultate der Studie ermöglichen die potentiellen Wege der Ausbreitung zwischen einzelnen Betrieben und Schlachthöfen von verschiedenen Genotypen zu erkennen, helfen die

Kreuzkontamination von Schlachtkörpern zu bestätigen und unterstützen die Verbesserung von Präventionsmaßnahmen auf Primärproduktionsebene.

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Infektionskette und Nachweis von <i>Campylobacter</i>	18
Abbildung 2: Prozentuelle Verteilung von <i>Campylobacter</i> Spezies isoliert aus Darm-, Halshaut- und einer Wasserprobe assoziiert zu verschiedenen Broilerbetrieben und Schlachthöfen (n=166 Isolate).	26
Abbildung 3: <i>Campylobacter jejuni</i> Genotypen und ihr Vorkommen in Mastbetrieben.....	27
Abbildung 4: <i>Campylobacter jejuni</i> Genotypen Wiederfindung in Darmkonvolut und Halshaut.....	29

10. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: <i>Campylobacter</i> als Prozesshygienekriterium in Broilerkarkassen.....	17
Tabelle 2: <i>Campylobacter</i> -Primer für die Speziesbestimmung.....	19
Tabelle 3: Mastermix Zusammensetzung für die <i>Campylobacter</i> Multiplex-PCR.....	20
Tabelle 4: PCR Konditionen.....	20
Tabelle 5: <i>Campylobacter</i> Isolatset und Spezies zugeordnet zu den Broilerbetrieben und zugehörigen Schlachthöfen.....	25
Tabelle 6: Genetische Diversität von <i>Campylobacter</i> basierend auf PFGE-Profilen.....	28

11. APPENDIX

Tabelle 1. Material und Equipment Liste.

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
I. Geräte	
Brutschrank 42°C	Sanyo, Japan
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank - 20 °C	Liebherr International AG, Bulle Schweiz
Gefrierschrank - 80 °C	Sanyo, Japan
GelDoc 2000 UV-Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Gelelektro /Elektrophorese-Unit	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Heizplatte	Kleinfeld Labortechnik GmbH., Gehrden, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Dometic Germany Holding GmbH., Deutschland
Mikrowelle	Silva Schneider Electric, Rueil-Malmaison, Frankreich
Milli-Q Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PFGE Kammer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Spektralphotometer	Shimadzu Europa GmbH., Duisburg, Deutschland
Thermocycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Vortex	Scientific Industries, USA
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
II. Verbrauchsmaterial	
1.5 ml MR Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2 ml Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
5 ml Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Agarose plug molds	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Blaue Impföse 10µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon tubes 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe nitril	Paul Hartmann GmbH., Wiener Neudorf, Österreich
Handschuhe vinyl	Semperit Technische Produkt GmbH., Wien, Österreich
Küvette für OD	Greiner AG, Deutschland
Parafilm	Bemis Company Inc., Neenah, USA
PCR tubes 0.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Sterilin Ltd., Newport, UK
Pipetten 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten 1-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1-1250 µl	Biozym Scientific GmbH., Hessisch Oldendorf, Deutschland
Weißer Impföse 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 1 fortgeführt. Material und Equipment Liste.

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
III. Chemikalien	
1 M Tris HCl	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
1 x TAE Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
1 x TBE Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
10 x TAE Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
10 x TE Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
100bp DNA ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10x PCR Puffer (-MgCl ₂)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
10x TBE Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Aqua bidest	B Braun Melsungen AG, Deutschland
Borsäure	VWR International GmbH, Radnor, USA
Bromophenol Blau	Honeywell International Inc., Morris Plains, USA
<i>Campylobacter</i> growth supplement (Oxoid SR0323E)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Chelex 100 [®] Resin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
CO ₂ , O ₂ , N ₂ Gasgemisch	Linde Gas GmbH, Stadl-Paura, Österreich
Columbia Blutagar	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DEPC Wasser	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
dNTP Mix (20mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH., Deutschland
Ethidium bromide	Sigma Aldrich , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glacial acetic acid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (G5516)	Sigma Aldrich Chemie GmbH., Deutschland
KCl	Fischer Scientific, Belgium
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laked horse blood (Oxoid SR0048C)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Lauroylsarcosine	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
MgCl ₂ (50 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Fisher Scientific, UK
PBS Puffer	Sigma Aldrich , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
peqGreen	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Platinum [®] Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Primer	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH., Wien, Österreich
Sample Loading Buffer (SLB)	Honeywell International Inc., Morris Plains, USA
SeaKem Gold [®] Agarose	Lonza AG, Basel, Schweiz
Skirrow selective supplement (Oxoid SR0069E)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Sma</i> I Enzym	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 1 fortgeführt. Material und Equipment Liste.

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
III. Chemikalien	
Steriles Wasser	erzeugt mit Milli-Q ; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tango Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trishydroxymethylaminomethane	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
TSAY	Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, Frankreich
<i>Xba</i> I Enzym	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellysis Puffer	Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA