

# Konventionelle PCR- und Real-Time PCR- Verfahren zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter jejuni*, *C. coli* und *C. lari*: ein Überblick

S. Lick<sup>1</sup>, A. Mayr<sup>2</sup>, M. Müller<sup>1</sup>, A. Anderson<sup>3</sup>, H. Hotzel<sup>4</sup> und I. Huber<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin

<sup>2</sup>Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim

<sup>3</sup>Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg (CVUA), Freiburg

<sup>4</sup>Friedrich-Löffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (IBIZ), Jena

Korrespondenz an: Dr. Sonja Lick, Bundesinstitut für Risikobewertung, Abt. 4 FG 42, Diederdorfer Weg 1, D-12277 Berlin. Tel.: 01888-412-2107, Fax: 01888-412-2951, E-mail: Sonja.Lick@bfr.bund.de

Eingegangen: 31. Januar 2007

**Key words:** *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, thermophile *Campylobacter*, Real-Time PCR, konventionelle PCR.

**Abkürzungen:** A = Adenin, *asp* = Aspartatkinase-Gen, BSA = Bovines Serumalbumin, C = Cytosin, *C.* = *Campylobacter*, *ceuE* = Gen für periplasmatisches Substratbindungsprotein, *flaA* = Flagellin A-Gen, G = Guanin, *gyrA* = Gyrase-Gen, *glyA* = Serin-Hydroxymethyltransferase, *hipO* = Gen für Hippurathydrolyse, Hippurikase-Gen, IAC = interne Amplifikationskontrolle, IFSG = Infektionsschutzgesetz, *ipxA* = UDP-N-Acetylglucosamin-Acyltransferase, M=A und C, *mapA*=Gen für ein membranassoziiertes Protein, MgCl<sub>2</sub> = Magnesiumchlorid, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, R = A und G, rev. = revers, RFLP = Restriktionslängenfragment-Polymorphismus, T = Thymin, vorw. = vorwärts, WHO = World Health Organisation, Y = C und T, *yphC* = GTPase-Gen, K = T und G.

**Zusammenfassung:** Eine Vielzahl von PCR-Nachweismethoden für *Campylobacter jejuni* und *C. coli* wurden bereits publiziert. Hier wird eine Zusammenfassung von aktuellen PCR-Nachweismethoden für thermophile *Campylobacter* spp. präsentiert, die dem Anwender exemplarisch eine schnelle tabellarische Übersicht über aktuelle Methoden bietet sowie über deren Zielgene und Spezifitäten. Es wurden vier konventionelle und sieben Real-Time PCR-Methoden zur Identifizierung von *Campylobacter* spp. verglichen. Bei den konventionellen Methoden handelt es sich um eine auf dem 16S rRNA-Gen basierende PCR, die spezifisch mit *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* reagiert, zwei auf dem Flagellin-Gen beruhende PCR-Typisierungsmethoden, die in modifizierter Form für *C. jejuni*, *C. coli* und zusätzlich für *C. lari* durchgeführt wurden. Als vierte Methode wurde eine Duplex-PCR zur Identifizierung von *C. jejuni*

und *C. coli* mit einbezogen. Unter den getesteten Real-Time PCR-Methoden befanden sich drei 5'-Nuklease Assays, die spezifisch *C. jejuni* detektieren, zwei Assays, die auf dem Flagellin-Gen beruhen und *C. jejuni* und *C. coli* gemeinsam erfassen, eine Duplex-PCR, die *C. jejuni* (*mapA*-Gen) und *C. coli* (*ceuE*-Gen) identifizieren kann und noch mit einer unveröffentlichten internen Kontrolle kombiniert wurde, sowie eine Lightcycler-Methode, die auf dem 16S rRNA-Gen basiert und *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* gemeinsam detektiert, aber nicht differenziert. Die Methoden sind entweder unverändert aus Publikationen übernommen oder auch nach Datenbankanalysen modifiziert worden. Zum Testen wurden 65 *Campylobacter*-Stämme aus 12 verschiedenen Spezies eingesetzt. Die Inklusivität war insgesamt bei allen Methoden sehr gut, bei der Exklusivität gab es Unsicherheiten. Real-Time PCR-Methoden, die auf dem Flagellin-Gen beruhen, können in manchen Fällen die verwandten Arten *C. lari* oder *C. upsaliensis* mit erfassen. Der enge Verwandte *C. hyoilei* wird in fast allen Fällen gleichzeitig mit *C. coli* detektiert.

**Abstract:** Many PCR-techniques have already been published for the detection of thermophilic *Campylobacters*. In order to provide a practical overview for the user – without laying claim to completeness – we present a collection of actual PCR detection methods, some of them were modified and some are still unpublished. They are listed along with their target genes and specificities. Four conventional and seven real-time PCR methods were tested and compared using a panel of 65 *Campylobacter* strains belonging to 12 different more or less related species. The regular PCR methods tested include the 16S rRNA gene based technique that specifically detects *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* without differentiating to species level, two *flaA* gene based typing-methods, one for *C. jejuni* and *C. coli* in combination, which was slightly modified according to Nachamkin et al. (1993, 1996),

and additionally for *C. lari*. Another duplex PCR was carried out which allows identification of the two species *C. jejuni* and *C. coli* simultaneously. Among the real-time methods tested there were three techniques allowing identification of *C. jejuni* alone, two assays based on the flagellin A gene capable to identify *C. jejuni* and *C. coli* in combination, a duplex PCR performed as triplex PCR combined with an internal amplification control that detected *C. jejuni* and *C. coli* separately, and a Lightcycler method that detected *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* simultaneously. Inclusivity and exclusivity were shown for each of the methods. In most cases inclusivity was good, but some techniques raised problems concerning exclusivity. Flagellin based real-time PCR techniques partially crossreacted either with *C. lari* or *C. upsaliensis*. *C. hyoilei* which is very closely related to *C. coli* reacted in almost all methods applied like *C. coli*.

## 1. Einleitung

Die Campylobacteriose gehört seit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (§ 42 IfSG) im Jahre 2001 zu den in Deutschland meldepflichtigen Gastroenteritiden. *Campylobacter* spp. sind derzeit alleine in Deutschland für mehr als 50.000 jährlich gemeldete Erkrankungsfälle verantwortlich und gehören weltweit zu den Hauptverursachern lebensmittelbedingter Infektionen des Gastro-Intestinaltraktes. Sie stehen in Deutschland inzwischen zahlenmäßig zusammen mit den Salmonellen an erster Stelle bakteriell verursachter Infektionen. Als Hauptinfektionsquellen werden nicht ausreichend erhitztes Geflügel oder andere Fleischprodukte sowie unpasteurisierte Milch und Trinkwasser angesehen. Unzureichende Hygiene bei der Speisenzubereitung und damit verbundene Rekontaminationen auf andere roh zu verzehrende Nahrungsmittel ist ebenso als kritisch einzustufen. Als verursachende Spezies sind nach heutigem Stand vor allem die thermophilen Arten *C. jejuni* und *C. coli* (z. B. in Geflügel), in geringerem Maße auch *C. lari* (z. B. in Muscheln) anzusehen.

Der Nachweis erfolgt in der Regel über einen Voranreicherungsschritt und die Kultivierung auf Selektivnährböden nach DIN EN ISO 10272. Es gewinnen aber zunehmend schnellere Nachweismethoden zum Screening von Lebensmitteln bezüglich einer *Campylobacter*-Kontamination und der Aufklärung von humanen Ausbrüchen an Bedeutung. Für gewöhnlich werden diese Methoden auch an eine Voranreicherung angeschlossen.

Es wurden bereits eine ganze Reihe von konventionellen wie auch Real-Time PCR Methoden zur Identifizierung von *C. jejuni* und *C. coli* veröffentlicht, die zumeist auf folgenden Strukturgenen basieren: *asp*, kodiert für eine Aspartatkinase (Linton et al., 1997), *ceuE*, kodiert für ein periplasmatisches Substratbindungsprotein (Best et al., 2003; Gonzalez et al., 1997), *mapA*, kodiert für ein membranassoziiertes Protein (Best et al., 2003; Houg et al., 2001), *flaA*, kodiert für das Flagellin A-Gen (Birkenhead et al., 1993; Harrington et al., 2003; Nachamkin et al., 1996; Nachamkin et al., 1993; Owen et al., 1993; Oyoyo et al., 1992; Sekizuka et al., 2005), *gyrA*, kodiert für eine Untereinheit der Gyrase (Iijima et al., 2004; Menard et al., 2005; Ragimbeau et al., 1998), *hipO*, kodiert für die Hippurikase (Denis et al., 1999;

Linton et al., 1997) und *yphC*, kodiert für eine GTPase (Iijima et al., 2004). Des Weiteren werden auch Gene für eine putative Oxidoreduktase (Nogva et al., 2000), für periplasmatische Proteine (van de Giessen et al., 1998) oder auch die 16S rDNA (Lübeck et al., 2003; Perelle et al., 2004) adressiert. Die Primer aus diesen Veröffentlichungen bzw. zahlreiche verschiedene Kombinationen davon sind in vielen Folgepublikationen zu finden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Auswahl von bereits publizierten PCR-Methoden hinsichtlich ihrer Spezifität miteinander zu vergleichen und gegebenenfalls einzelne Methoden nach neueren Datenbankanalysen zu optimieren. Es wurden vier konventionelle PCR-Methoden und sieben Real-Time PCR-Methoden miteinander verglichen. Die erste konventionelle PCR-Methode basiert auf der 16S rDNA (Lübeck et al., 2003) und amplifiziert ein spezifisches Fragment von 287 bp bei *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*. Sie wurde bereits in einem Europäischen Ringversuch getestet. Bei der zweiten Methode handelt es sich um eine Duplex-PCR, die den Nachweis und die Unterscheidung von *C. jejuni* und *C. coli* erlaubt (van de Giessen et al., 1998). Sie wurde auf europäischer Ebene im Rahmen des "Global Salm Survey`s" in Trainingskursen der WHO eingesetzt. Des Weiteren wurden zwei auf dem Flagellin A-Gen (*flaA*) basierende PCR-Typisierungsmethoden (PCR-RFLP) getestet, die sich den Polymorphismus des Gens zunutze machen. Hierbei wird eine Differenzierung auf Stammebene durch anschließende Restriktionsanalyse ermöglicht. Die stammspezifische Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* (Nachamkin et al., 1993) ist wegen ihrer kostengünstigen, einfachen und schnellen Anwendbarkeit auf europäischer Ebene im Rahmen des CAMPYNET mit anderen auf dem Flagellin-Gen beruhenden Typisierungsmethoden verglichen worden (Harrington et al., 2003) und wurde in dieser Arbeit mit einem modifizierten 5'-Primer getestet. Zudem wurde noch eine PCR-Typisierung für *C. lari* mit neuen Primern eingeführt, die unter identischen Zeit-Temperatur Bedingungen eingesetzt werden kann. Unter den sieben Real-Time PCR-Methoden war eine Duplex-PCR (Best et al., 2003), die *C. jejuni* (*mapA*) und *C. coli* (*ceuE*) identifiziert und mit einer internen Amplifikationskontrolle (Anderson et al., eingereicht) kombiniert wurde. Zwei Real-Time PCR-Methoden mit der Spezifität für *C. jejuni* und *C. coli* basieren auf dem Flagellin A-Gen (Anderson, 2005; diese Arbeit). Ihr vorwärts gerichteter Primer stimmt weitgehend mit dem von Oyoyo et al. (1992) beschriebenen überein, während die rückwärts gerichteten Primer und die Taqman-Sonden neu konstruiert wurden (Tab. 1). Weiterhin wurden die Methoden von Iijima et al. (2004) und nach Nogva et al. (2000) verglichen, die für *C. jejuni* spezifisch sind. Ergänzend wurde die Lightcycler-Real-Time PCR nach Perelle et al. (2004) eingesetzt, die die gleichen Primer benutzt wie die konventionelle Methode nach Lübeck et al. (2003) mit der Spezifität für *Campylobacter jejuni*, *coli* und *lari*.

65 *Campylobacter*-Stämme wurden zum Testen eingesetzt, darunter 18 Stämme von *C. jejuni*, 8 Stämme von *C. coli* und 14 Stämme von *C. lari*. Zusätzlich wurde eine Reihe anderer nahe verwandter *Campylobacter*-Arten getestet, die entweder aus offiziellen Stammsammlungen bezogen oder aus Lebensmitteln bzw. Tieren isoliert worden waren. Weiterhin wurden auch eine Reihe von Proben und Isolaten aus Lebensmittel-Voranreicherungen der Routinediagnostik auf thermophile *Campylobacter* spp. untersucht.

Tab. 1 Primer und Sonden für qualitative PCR und Real-Time PCR.

Zielgen (Spezifität)	5 – 3' Sequenz	Produkt	Bedingungen	Referenz
<b>qualitative PCR</b>				
<b>16S rDNA (Eubakterien)</b>		1074 bp	94 °C 10 min; 35 (45) Zyklen: 92 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min 30 s, 1 Zyklus: 72 °C 5 min	Vaneechoutte et al. (1992) Lane (1991)
vorw. Primer	TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC			
rev. Primer	GGGTTGCGCTCGTTG			
<b>16S rDNA (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i>, <i>C. lari</i>)</b>		287 bp	94 °C 10 min; 35 (45) Zyklen: 92 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 1 Zyklus 72 °C 4 min	Lübeck et al. (2003)
vorw. Primer	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG			
rev. Primer	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA			
<b>flaA-Typisierung (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i>)</b>		1725 bp	94 °C 10 min; 35 (45) Zyklen: 92 °C 30 s, 57 °C (45 °C) 45 s, 72 °C 2 min 30 s, 1 Zyklus: 72 °C 5 min	Harrington et al. (2003); Nachamkin et al. (1993) diese Arbeit, mod.
vorw. Primer urspr.	GGATTCGTATTAACACAAATGGTgc			
vorw. Primer mod.	GGATTCGTATTAACACMAATGKT			
rev. Primer	CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG			
<b>flaA-Typisierung (<i>C. lari</i>)</b>		1630 bp	94 °C 10 min; 35 (45) Zyklen: 92 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 2 min 30 s, 1 Zyklus: 72 °C 5 min	diese Arbeit
vorw. Primer	GGATTCGTATAAATACTAATGTG			
rev. Primer	TGAGCTAGGATGTTAAATTTAGCAA			
<b>Duplex-PCR</b>				
put. <b>periplasm. Protein (<i>C. jejuni</i>)</b>		766 bp	94 °C 12 min; 2 Zyklen: 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min; 2 Zyklen: 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min, 2 Zyklen: 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 2 Zyklen: 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 Zyklen: 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min; 1 Zyklus: 72 °C 5 min	van de Giessen et al. (1998)
vorw. Primer	AAGATATGGCACTAGCAAGAC			
rev. Primer	CATCTTCCCTAGTCAAGCCT			
<b>unbekannt (<i>C. coli</i>)</b>		364 bp		
vorw. Primer	AGGCAAGGGAGCCTTTAATC			
rev. Primer	TATCCCTATCTACAAATTCGC			
<b>Lightcycler</b>				
<b>16S rDNA (<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i>, <i>C. lari</i>)</b>		287 bp		Perelle et al. (2004)
vorw. Primer	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG			
rev. Primer	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA			
Lightcycler Sonden	LC-Red640–CGCAATGGGGAAACCC-PH GGAGGCAGCAGTAGGGAATAT-FL			
<b>5' Nuklease-Assay</b>				
<b>yphC (<i>C. jejuni</i>)</b>		113 bp	95 °C 10 min; 40 Zyklen: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min	Iijima et al. (2004)
vorw. Primer	CATTCTCAAATAGCACTTTTGGTTTT			
rev. Primer	GCCCAGCAATGCGTTCA			
Taqman-Sonde	Fam-TGCCGATGAGGGCTTTAACGAGC -Tamra			
<b>gyrA (<i>C. jejuni</i>)</b>		111 bp	95 °C 10 min; 40 Zyklen: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min	Iijima et al. (2004)
vorw. Primer	AAGATACGGTCGATTTTGTCCA			
rev. Primer	CTACAGCTATACCACTTGAACATTTAATA			
Taqman-Sonde	Fam-TGATGGTTCAGAAAGCGAACCTGATGTTttt-Tamra			
Taqman-Sonde mod.	Fam-TATGATGGTTCAGAAAGYGAAYCTGATGT-Tamra			diese Arbeit

Tab. 1 Fortsetzung

Zielgen (Spezifität)	5 – 3` Sequenz	Produkt	Bedingungen	Referenz
<b>5` Nuklease-Assay</b>				
put. <b>Oxidoreduktase</b> ( <i>C. jejuni</i> )		86 bp	95 °C 10 min; 40 Zyklen: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min	Nogva et al. (2000)
vorw. Primer	CTGAATTTGATACCTTAAGTGCAGC			
rev. Primer	AGGCACGCCTAAACCTATAGCT			
Taqman-Sonde	Fam-TCTCCTTGCTCATCTTTAGGATAAATCTTTCCACA-Tamra			
<b>flaA</b> <sup>1)</sup> ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> )		197 bp	50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 45 Zyklen: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min	Anderson (2005)
vorw. Primer	ATGGGATTTTCGTATTAACAC			
rev. Primer	GATATAGCTTGACCTAAAGTA			
Taqman-Sonde	Fam-CTATCGCCATCCCTGAAGCATCATCTG-Tamra			
<b>flaA</b> <sup>2)</sup> ( <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> )		220 bp	95 °C 10 min; 40 Zyklen: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min	diese Arbeit, mod. nach Anderson (2005)
vorw. Primer	ATGGGATTTTCGTATTAACAC			
rev. Primer	ACCYAAAGCATCRTTACCATT			
Taqman-Sonde	Fam-ATMGCCATCCCTGAAGCATCATCTGC-Tamra			
<b>Duplex-PCR:</b>				
<b>ceuE</b> ( <i>C. coli</i> )		102 bp	50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 45 Zyklen: 94 °C 30 s, 60 °C 45 s 72 °C 30 s	Best et al. (2003)
vorw. Primer	AAGCTCTTATTGTTCTAACCAATTCTAACA			
rev. Primer	TCATCCACAGCATTGATTCCTAA			
Taqman-Sonde	CY5-TTGGACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATT-BBQ			
<b>mapA</b> ( <i>C. jejuni</i> )		95 bp		
vorw. Primer	CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT			
rev. Primer	CAATACCAGTGTCTAAAGTGCCTTTAT			
Taqman-Sonde	FAM-TTGAATTCCAACATCGCTAATGTATAAAAGCCCTTT-DB.			

## 2. Material und Methoden

Reinkulturen von *Campylobacter* spp. wurden auf Müller-Hinton-Agar mit 5% Schafblut (Oxoid, Wesel), Müller-Hinton-Schokoladen Agar (Oxoid, Wesel) oder in Brucella Bouillon (Difco, Heidelberg) unter mikroaeroben Bedingungen (ca. 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> und 85% N<sub>2</sub>, z. B. Merck, Anaerocult C System, Darmstadt) bei 37 °C gezüchtet. Bei den thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* betrug die Bebrütungstemperatur 42 °C. *C. concisus*, *C. curvus*, *C. helveticus*, *C. upsaliensis* benötigen eine anaerobe Gasatmosphäre, die H<sub>2</sub> enthält (Becton & Dickinson GasPak Systeme: CampyPak, Heidelberg).

Es wurden Stämme aus offiziellen Stammsammlungen (*C. jejuni* RM1221, *C. lari* DSMZ 11375, *C. lari* CCUG 19512, *C. lari* CCUG 23947, *C. lari* CCUG 18294, *C. upsaliensis* CCUG 14913, *C. sputorum* bv *paraureolyticus* CCUG 37580, *C. concisus* DSMZ 9716, *C. concisus* CCUG 19996, *C. curvus* CCUG 13146, *C. helveticus* CCUG 33880, *C. hyoilei* CCUG 33450, *C. hyoilei* CCUG 33769, *C. hyoilei* CCUG 34482) oder andere gut charakterisierte Isolate aus Lebensmitteln verwendet.

Bei den untersuchten Lebensmitteln handelte es sich um Proben aus der Routineanalytik, die parallel zu kulturellen Nachweismethoden mittels PCR untersucht wurden. Dies umfasste eine 48-stündige Anreicherung in Prestonbouillon (Oxoid, Wesel), an die sich ein Ausstrich auf Blutplatten (siehe oben) mit anschließender Subkultivierung und morphologischer sowie biochemischer Bestätigung verdächtiger Kolonien anschloß. Es wurden entweder die Anreicherungen direkt (1 ml) oder Isolate daraus eingesetzt.

Die Nukleinsäuren wurden entweder mit einer gängigen Phenolextraktionsmethode (z. B. Oyfo et al., 1992) oder mit geeigneten Kits (z. B. Nucleo Spin Food, Macherey & Nagel) präpariert. Bei Reinkulturen wurde teilweise auch nur Nukleinsäure-Rohextrakt verwendet. Die Zellsuspension einer Übernachtskultur (1 ml) wurde mit TE-Puffer (Tris 0.010 M, EDTA 0,001 M pH 8,0) einmal gewaschen, in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und 20 min aufgekocht. Anschließend wurden 5 µl des Überstandes direkt in den PCR-Reaktionsmix eingesetzt.

Es wurden vier konventionelle PCR- und sieben Real-Time PCR-Methoden getestet und verglichen. In Tab. 1 sind die Pri-

mer und Sonden sowie Zeit- und Temperatur-Profile mit den entsprechenden Referenzen beschrieben.

Die Amplifizierbarkeit der Nukleinsäure wurde durch die parallele Anwendung verschiedener Methoden gesichert, da in den meisten Fällen (Tab. 2) keine interne Amplifikationskontrolle mitgeführt wurde. Im Falle von anderen *Campylobacter*-Spezies als *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* wurde zusätzlich eine PCR mit Primern durchgeführt, die für Eubakterien beschrieben sind (Lane, 1991; Vanechoutte et al., 1992).

Zusammensetzung der Reaktionsgemische für die konventionellen PCR-Methoden:

**Methode 1** [16S rDNA-PCR nach Lübeck et al. (2003) für *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*]: 50 µl Reaktionsansatz enthielten: jedes der dNTPs 0,2 mM, Primer je 0,2 µM, MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM, Tween 20 0,1%, 0,5 U Ampli-Taq-Gold (Applied Biosystems, Darmstadt).

**Methode 2** [Modifizierte *flaA*-PCR-RFLP zur Schnell-Typisierung für *C. jejuni* und *C. coli* nach Harrington et al. (2003) und Nachamkin et al. (1993)] und

**Methode 3** [*C. lari*-spezifisch, diese Arbeit]: 50 µl Reaktionsansatz enthielten: dNTPs je 0,08 mM, jeder Primer 0,2 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tween 20 0,1%, 1,0 U Ampli-Taq-Gold (Applied Biosystems, Darmstadt); Restriktion der PCR-Fragmente (RFLP) mit *DdeI* (30 µl PCR-Produkt, 14 µl TE-Puffer, 5 µl Restriktionsendonukleasepuffer, 10 U Restriktionsenzym) für alle drei *Campylobacter*-Spezies; als zweites Restriktionsenzym eignet sich *Hinfi* bei *C. jejuni*, *C. coli* und *MaeIII* bei *C. lari*.

**Methode 4** [Multiplex-PCR zur Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli* nach van de Giessen et al. (1998)]: 50 µl Reaktionsansatz enthielten: dNTPs je 0,08 mM, jeder Primer 2,0 µM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, Tween 20 0,1%, 1,0 U Ampli-Taq-Gold (Applied Biosystems, Darmstadt).

Zusammensetzung der Reaktionsgemische für die Real-Time PCR-Methoden: Falls nicht anders erwähnt wurden die Experimente mit dem ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

**Methode 5 und 6** (basierend auf dem *yphC*-Gen (GTPase) und dem *gyrA*-Gen (Gyrase) spezifisch für *C. jejuni* nach Iijima et al. (2004) und

**Methode 7** [basierend auf dem Gen für eine putative Oxidoreduktase nach Nogva et al. (2000)]: 25 µl Reaktionsansatz enthielten: 12,5 µl Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt), jeder Primer 0,3 µM, Taqman-Sonde 0,25 µM, BSA 0,1 µg/µl.

**Methode 8** [basierend auf dem *flaA*-Gen mit der Spezifität für *C. jejuni* und *C. coli*; diese Arbeit]: 25 µl Reaktionsansatz enthielten: 12,5 µl Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt), vorw. Primer 0,3 µM, rev. Primer 0,6 µM, Taqman-Sonde 0,25 µM, BSA 0,1 µg/µl.

**Methode 9** [basierend auf dem *flaA*-Gen mit der Spezifität für *C. jejuni* und *C. coli* nach Anderson (2005)]: 25 µl Reaktionsansatz enthielten: 12,5 µl Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt), jeder Primer 0,9 µM, Taqman-Sonde 0,15 µM.

**Methode 10** [basierend auf dem *mapA*-Gen mit der Spezifität für *C. jejuni* und auf dem *cevE*-Gen mit der Spezifität für *C. coli* nach Best et al. (2003) kombiniert mit einer internen Amplifikationskontrolle nach Anderson et al. (eingereicht), durchgeführt mit dem Stratagene MX3000P]: 25 µl Reaktionsansatz enthielten: 12,5 µl Brilliant Multiplex QPCR Mastermix (Stratagene, Heidelberg), alle Primer 0,3 µM, alle Taqman-Sonden 0,1 µM, 12,5 Kopien Plasmid-DNA.

**Methode 11** [basierend auf der 16S rDNA mit der Spezifität für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* nach Perelle et al. (2004), durchgeführt auf dem Lightcycler]: 20 µl Reaktionsansatz enthielten: Lightcycler Faststart DNA master hybridization probes mix (Applied Biosystems), alle Primer 0,5 µM, Lightcycler-Sonden 0,2 µM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

Die zugegebene Nukleinsäuremenge betrug in der Regel zwischen 2,5 und 25 ng oder 5 µl des aufgekochten Überstandes der Zellsuspension. Der Ausschlusswert wurde bei 39 Zyklen gewählt. Vergleichende Sequenzanalysen wurden entweder mit Clustal X (Thomson et al., 1997) oder Bioedit (Version 7.04.2; Hall, 1999) durchgeführt und mit Genedoc (Version 2.6.02; Nicholas und Nicholas, 1997) editiert.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die getesteten PCR-Nachweisverfahren beruhen auf „single copy“-Genen (mit Ausnahme des 16S rRNA-Gens, welches in 3 Kopien auf dem Genom von *C. jejuni* vorkommt) und sollten daher eine vergleichbare Sensitivität besitzen. Die Ergebnisse der einzelnen Methodenvergleiche sind in Tab. 2 zusammengefasst, die jeweils die Inklusivität und die Exklusivität jeder Methode angeben. Unter Inklusivität ist die Anzahl der tatsächlichen positiven Proben zur erwarteten Anzahl zu verstehen, unter Exklusivität die Anzahl der tatsächlichen negativen Ergebnisse zur erwarteten Anzahl. Es wurden insgesamt 65 Stämme eingesetzt, darunter 18 Stämme von *C. jejuni*, 8 Stämme von *C. coli* und 14 Stämme von *C. lari*. Dabei wurde auch Wert darauf gelegt, andere nahe verwandte *Campylobacter*-Spezies zu prüfen, da diese in vielen Arbeiten bisher kaum miteinbezogen worden waren.

#### 3.1 Konventionelle PCR-Methoden

Die auf der 16S rDNA basierende Methode nach Lübeck et al. (2003) zeigte eine Inklusivität von 100% wie auch eine sehr gute Exklusivität. Allerdings ergab auch *C. hyoilei* ein deutliches Amplifikat der entsprechenden Größe. Auch mit dem Lightcycler Real-Time PCR-System nach Perelle et al. (2004), das die gleichen Primer verwendet, wurde ein positives Signal mit DNA von *C. hyoilei* erzielt. Diese *Campylobacter*-Spezies ist ein enger Verwandter von *C. jejuni* und *C. coli*, dessen 16S rDNA

Tab. 2 Ergebnisse der konventionellen PCR und der Real-Time PCR.

Spezies	Anzahl getesteter Stämme	Qualitative PCR-Methoden					Real-Time PCR-Methoden											
		1 16S rRNA <sup>1)</sup>	2 flaA-Typi- sierung mod. <sup>2)</sup> nach <sup>2)</sup>	3 flaA-Typi- sierung <sup>3)</sup>	4 Duplex-PCR <sup>4)</sup>	5 yphC <sup>5)</sup>	6 gyrA mod. <sup>6)</sup> nach <sup>6)</sup>	7 Put. Oxido- reduk- tase <sup>7)</sup>	8 flaA <sup>8)</sup>	9 flaA <sup>9)</sup>	10 Triplex: mapA + ceuE + IAC <sup>10)</sup>	11 Light- cycler 16S rRNA <sup>11)</sup>						
		Spezifität	C. jej., coli	C. lari	C. coli	C. jej.	C. coli	C. jej.	C. coli	C. jej.	C. coli	C. jej., coli	C. coli	C. jej., coli	C. coli	C. jej., coli	C. coli	C. coli
C. jejuni	18		18	0	18	0	0	18	0	18	0	18	17	18	0	18	0	18
C. coli	8		8	0	0	8	0	0	8	3(3)	0	8	8	0	8	0	8	8
C. lari	14		14	11	0	0	0	0	0	(2)	0	0	3(3)	0	0	0	0	14
C. concisus	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C. curvus	1		(1)***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C. fetus ssp. fetus	3		0	0	0	0	0	0	0	(2)	0	0	0	0	0	0	0	0
C. fetus ssp. venerealis	4		0	0	0	0	0	0	0	(2)	0	0	0	0	0	0	0	0
C. helveticus	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(1)	0	0	0	0	0
C. hyointestinalis	3		0	0	0	0	0	0	0	(1)	0	0	0	0	0	0	0	0
C. hyoilei	3		3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	3
C. upsaliensis	6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1(1)	0	0	0	0
C. sputorum	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Insgesamt	65	Inklusivität*	43 (1)/40	29/26	11/14	18/18	8/8	21(10)/18	18(2)/18	18(2)/18	19(4)/18	32(1)/26	33(5)/26	18(1)/18	8/8	40/40		
		Exklusivität**	21(1)/25	36/39	54/51	47/47	57/57	34(10)/47	45(2)/47	45(2)/47	42(4)/47	32(1)/39	28(5)/39	46(1)/47	54/57	22/25		

\*Anzahl der positiv getesteten Stämme im Verhältnis zur erwarteten Anzahl  
 \*\*Anzahl der negativ getesteten Stämme im Verhältnis zur erwarteten Anzahl  
 \*\*\*Zahlen in Klammern beziehen sich auf zweifelhaft, schwach positive Signale (Ct-Wert > 35); Ausschlusswert Ct > 39

<sup>1)</sup> Methode 1: Lübeck et al. (2003)  
<sup>2)</sup> Methode 2: diese Arbeit, mod. nach Nachamkin et al. (1993)  
<sup>3)</sup> Methode 3: diese Arbeit  
<sup>4)</sup> Methode 4: van de Giessen et al. (1998)  
<sup>5)</sup> Methode 5: Iijima et al. (2004)  
<sup>6)</sup> Methode 6: Iijima et al. (2004)  
<sup>7)</sup> Methode 7: Nogva et al. (2000)  
<sup>8)</sup> Methode 8: diese Arbeit, modif. nach Anderson (2005)  
<sup>9)</sup> Methode 9: Anderson (2005)  
<sup>10)</sup> Methode 10: mapA und ceuE: Best et al. (2003), IAC: Anderson et al. (eingereicht)  
<sup>11)</sup> Methode 11: Perelle et al. (2004)

sich nur um wenige (4 bzw. 5) Basenpaare von *C. jejuni* und *C. coli* unterscheidet (Alderton et al., 1995). Die Sequenzierung der 16S rDNA der drei *C. hyoilei*-Stämme zeigte, dass alle drei die größte Übereinstimmung mit *C. coli* haben. Derzeit ist die Nomenklatur von *C. hyoilei* bei dem Internationalen Komitee für die Systematik von Prokaryoten wieder in der Diskussion und man scheint die Wiederzuordnung der Spezies zu *C. coli* zu favorisieren (On, 2001).

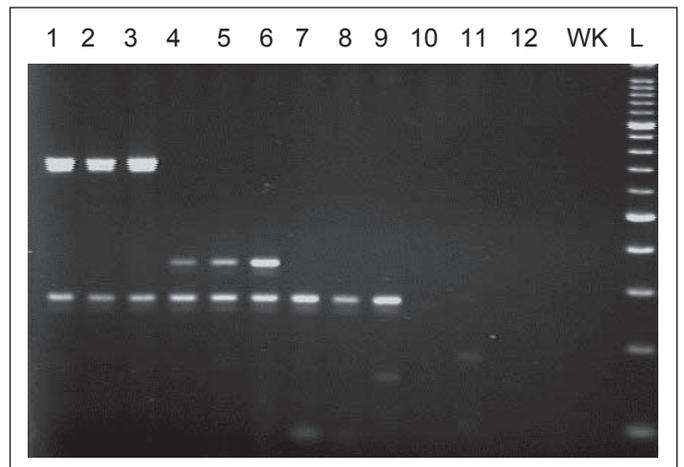
Nachweismethoden, die auf dem Flagellin A-Gen beruhen, sind sehr verbreitet und werden auch schon sehr lange zur Identifizierung eingesetzt. *C. jejuni* und *C. coli* besitzen jeweils zwei Flagellin-Gene (A und B), die in tandem nacheinander auf dem Genom angeordnet sind. Das *flaB*-Gen ist dem *flaA*-Gen ähnlich, aber nicht mit ihm identisch und noch viel variabler. *C. upsaliensis* besitzt ebenfalls zwei Flagellin-Gene, allerdings nicht in dieser unmittelbaren topologischen Nähe auf dem Genom.

Eine sehr verbreitete konventionelle PCR-Nachweismethode für *C. jejuni* und *C. coli* wurde von Oyoyo et al. (1992) veröffentlicht. Diese wurde hier nicht getestet, da im Bereich des 3'-Primers nach neueren, in den Datenbanken verfügbaren Sequenzen erhebliche Basenfehlpaarungen zu finden waren.

Methode 2 und 3 entsprechen in modifizierter Form der auf dem *flaA*-Gen basierende PCR-RLFP nach Nachamkin et al. (1993). Diese PCR-Typisierung macht sich zunutze, dass es Bereiche gibt, die eher konserviert sind, wie der N-terminale und der C-terminale Bereich, während der mittlere Bereich in Abschnitten sehr variabel ist. Die Primer liegen in den konservierten Regionen und damit wird nahezu das ganze *flaA*-Gen amplifiziert. Das Amplifikat kann anschließend mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, so dass unterschiedliche stammspezifische Restriktionsmuster entstehen. In der Arbeit von Harrington et al. (2003) wurden drei Flagellin-PCR-RFLP miteinander verglichen (Alm et al., 1993; Ayling et al., 1996; Nachamkin et al., 1993; Nachamkin et al., 1996; Santesteban et al., 1996). Es wurde zwar bei Alm et al. (1993) und Santesteban et al. (1996) eine höhere Rate in der Amplifizierbarkeit festgestellt, aber die Differenzierbarkeit war auf Grund der Länge des Amplifikates bei der Methode von Nachamkin et al. (1993) besser. In dieser Studie wurde der vorwärts gerichtete Primer für *C. jejuni* und *C. coli* modifiziert (Tab. 1), da bei den in Datenbanken zugänglichen Sequenzen des *flaA*-Gens von *C. jejuni* und *C. coli* an zwei Genloci regelmäßige Nukleotidaustausche zu finden waren (Abb. 1). Eine gemischte Synthese mit einem Vorwärts-Primer, der an zwei Positionen „gewobbelt“ war, sollte eine Verbesserung erzielen. Nach Harrington et al. (2003) wurden bei einigen Stämmen von *C. coli* und *C. jejuni* keine oder nur sehr schwache Amplifikate erzeugt und musste daher die Anlagerungstemperatur für die Primer auf 45 °C gesenkt werden. Von den 26 getesteten Stämmen von *C. jejuni* und *C. coli* konnten alle ohne Absenkung der Primer-Anlagerungstemperatur amplifiziert werden. Auch hier zeigt sich die enge Verwandtschaft zu *C. hyoilei*, da bei diesen ebenfalls – wenn auch schwache – Amplifikate entstanden. Die Primer, die nach Datenbankanalysen spezifisch für *C. lari* konstruiert wurden, ergaben bei den meisten (11 von 14) das erwartete Amplifikat von 1630 bp Größe. Die anderen drei Stämme zeigten nur ein schwaches Produkt der erwarteten Größe bzw. kleinere Produkte. Der Polymorphismus des *flaA*-Gens scheint bei *C. lari* noch stärker ausgeprägt zu sein. Es wurde aber keine Amplifikation bei anderen Spezies festgestellt.

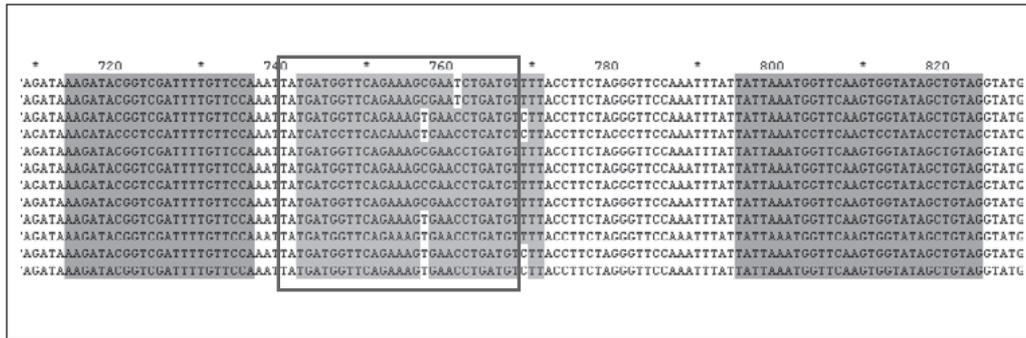


**Abb. 1** 5'-Region aus dem *flaA*-Gen von mehreren *Campylobacter jejuni*-Stämmen. Dunkelgrau unterlegt ist der 5'-Primer nach Oyoyo et al. (1992), hellgrau unterlegt und umrandet der 5'-Primer für die PCR-RFLP nach Nachamkin et al. (1993). Nicht unterlegt sind Basenpaaraustausche, gestrichelt umrandet ist der hier in der Arbeit verwendete 5'-Primer für die auf dem *flaA*-Gen basierende PCR-RFLP.



**Abb. 2** Triplex-PCR zur Identifizierung von *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, kombiniert nach Lübeck et al. (2003) und van de Giessen et al. (1998). Bahn 1, 2, 3: *C. jejuni* DSM 4688, 760, 3742; Bahn 4, 5, 6: *C. coli* 4689, BFR 3644, BFR 2033; Bahn 7, 8, 9: *C. lari* DSMZ 11375, BFR 072, BFR 4310; Bahn 10: *C. fetus ssp. fetus* DSM 5361; Bahn 11: *C. upsaliensis* DSM 5365; Bahn 12: *C. helveticus* K.3.1.; WK: Wasserkontrolle; L: 100 bp Leiter.

Methode 4 ist eine Duplex-PCR, welche die parallele Identifizierung von *C. jejuni* und *C. coli* ermöglicht (van de Giessen et al., 1998). Sie ergab bei den getesteten Stämmen sowohl 100% Inklusivität als auch 100% Exklusivität. Im Gegensatz zu anderen Methoden war bei *C. hyoilei* kein PCR-Produkt festzustellen. Bei *C. jejuni* wird der Übergang zwischen zwei aneinandergrenzenden Genen, die für zwei potentielle periplasmatische Proteine kodieren, amplifiziert. Bei *C. coli* ist die Funktion des Zielgens derzeit noch unbekannt. Eine Kombination dieser Methode mit der nach Lübeck et al. (2003) zu einer Triplex-PCR liefert jeweils ein 287 bp großes Produkt für *C. lari*, *C. jejuni* oder *C. coli* (Abb. 2) und zusätzlich ein 766 bp großes Fragment für



**Abb. 3** Primer und Taqman-Sonde (Mitte) aus dem Gyrase-Gen am Beispiel von einigen *Campylobacter jejuni*-Stämmen für den 5'-Nuklease Assay nach Iijima et al. (2004). Die Taqman-Sonde wurde für diese Arbeit verändert und ist hier umrandet dargestellt, die ursprüngliche Taqman-Sonde ist grau unterlegt, Basenpaaraustausche sind nicht unterlegt.

*C. jejuni* oder ein 364 bp großes Fragment für *C. coli*. Die Ergebnisse entsprechen denen der Einzelergebnisse aus Tab. 2, wobei aber *C. lari* mit *C. hyoilei* verwechselt werden könnte.

### 3.2 Real-Time PCR-Methoden

Real-Time PCR-Methoden werden in der Routineanalytik zunehmend beliebter, da keine gelektrophoretische Analyse mehr benötigt wird, sondern die weitere Bestätigung der Identität des PCR-Produktes durch Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde zeitgleich erfolgt. Ein weiterer Vorteil neben der Zeitersparnis ist ein geringeres „carry over“-Problem durch vorangegangene PCR-Reaktionen, da die Reaktionsgefäße nach Ablauf des Experimentes nicht mehr geöffnet werden müssen.

Hier werden zwei Real-Time PCR-Methoden (Methode 8 und 9, Tab. 2) beschrieben, die auf dem *flaA*-Gen beruhen und spezifisch für *C. jejuni* und *C. coli* reagieren (Anderson, 2005; diese Arbeit). Beide besitzen identische 5'-Primer, aber unterschiedliche reverse Primer und Taqman-Sonden. Methode 9 nach Anderson (2005) wurde bereits ausführlich an mehr als 150 Lebensmittelproben aus der Routinediagnostik getestet. Die Inklusivität für *C. jejuni* und *C. coli* ist 100%. Die Methode erfasst aber auch teilweise die nahen Verwandten *C. lari* sowie *C. helveticus*. Um eine Verbesserung der Spezifität und der Intensität des Fluoreszenzsignals zu erhalten, wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt und sämtliche zur Verfügung stehende *flaA*-Sequenzen, die über einen relevanten Sequenzbereich verfügten, verglichen (221 Stämme von *C. jejuni*, 72 Stämme von *C. coli*, 33 Stämme von *C. lari*, 2 Stämme von *C. upsaliensis*). Der reverse Primer und die Sonde wurden dementsprechend modifiziert. Allerdings reagierten nun Stämme von *C. upsaliensis* positiv (4 von 6) und die *C. hyoilei*-Stämme schwach positiv mit vermindertem Fluoreszenzsignal, was wieder die enge Verwandtschaft zu *C. coli* deutlich macht (vergleiche Methode 1, 10, 11 und 4 in Tab. 2).

Da das Flagellin-Gen einen hohen Grad an Polymorphismus aufweist, haben sich eine Reihe von neueren Arbeiten auf andere Zielgene konzentriert, die unter einem höheren Selektionsdruck stehen, z. B. solche, die für zentrale oder andere lebenswichtige Stoffwechselforgänge kodieren.

Die Arbeiten von Iijima et al. (2004) und Nogva et al. (2000) sind als spezifisch für *C. jejuni* beschrieben und bereits ausführlich getestet worden. Die Methoden 5 und 6 (Iijima et al., 2004) waren allerdings nur mit der Spezies *C. jejuni* überprüft

worden. Sie zielen auf die Gene für die Gyrase (*gyrA*) und für eine GTPase-Untereinheit (*yphC*) ab. Primer und Sonden wurden unverändert übernommen mit Ausnahme der Taqman-Sonde für das Gen der GTPase-Untereinheit (Tab. 1 und Abb. 3). Es wurde in dieser Arbeit eine Sondenpopulation mit vier verschiedenen Taqman-Sonden eingesetzt, die unterschiedliche Amplifikate gleichermaßen sensitiv detektieren kann. Die Methode 7 nach Nogva et al. (2000) basiert auf einer putativen Oxidoreduktase. Die Inklusivität war bei allen drei Methoden 100%. Die Sensitivität lag bei der auf dem *yphC*-Gen basierenden Methode höher als bei den anderen beiden (ca. 2–3 Zyklen, entspricht circa einem Faktor 10), aber es gab bei dieser Methode auch Unsicherheiten bei der Exklusivität u. a. bei den Arten *C. coli* und *C. lari*. Dies bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Methode 10 ist eine Duplex-PCR nach Best et al. (2003), welche die gleichzeitige Identifizierung von *C. jejuni* und *C. coli* beschreibt und auf den Genen für *mapA* und *ceuE* beruht. Sie wurde mit einer internen Amplifikationskontrolle (Anderson et al., eingereicht) zu einer Triplex-PCR kombiniert. Sowohl Inklusivität als auch Exklusivität waren sehr gut. Mit der auf der 16S rDNA basierenden Lightcycler-Methode (Methode 11; Perelle et al., 2004) konnte ebenso ein sehr gutes Ergebnis (100% Inklusivität, 88% Exklusivität) erzielt werden. Die Exklusivität wurde bei den beiden zuletzt genannten Methoden dadurch herabgesetzt, dass die nahe verwandten Stämme von *C. hyoilei* wie erwartet positiv reagierten (s. o.). Eine vergleichbares auf der 16S rDNA basierendes Verfahren ist auch als Taqman-System veröffentlicht (Josefsen et al., 2004), dieses wurde aber hier nicht getestet.

Weitere publizierte Methoden, die der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollten und die von den jeweiligen Autoren ausführlich getestet worden waren, beruhen z. B. auf dem *cadF*-Virulenzfaktor, einem äußeren Membranprotein, das die Bindung an die intestinalen Epithelzellen vermittelt. Die Primer sind gegen *C. coli* und *C. jejuni* gerichtet (Konkel et al., 1999) und wurden in der Arbeit von Englen et al. (2002) mit anderen Methoden verglichen. Eine weitere Arbeit beruht auf dem *lpxA*-Gen, das eine UDP-N-Acetylglucosamin Acyltransferase kodiert (Klena et al., 2004) und deren Primer *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli* und *C. upsaliensis* gleichzeitig identifizieren können. Fermer et al. (1999) beschreiben eine PCR-RFLP, die auf der 23S rDNA beruht und eine Differenzierung der Spezies mit Hilfe der Restriktionsenzyme *AluI* und *Tsp509I* erzielt. Wang et al. (2002)

kombinierten eine Multiplex-PCR aus den oben beschriebenen Primern gegen das *hipO*-Gen für *C. jejuni* mit Primern gegen das *glyA*-Gen (Serin-Hydroxymethyltransferase) für *C. coli* und *C. upsaliensis* und gegen das *sapB2*-Gen (Zelloberflächenprotein) für *C. fetus* ssp. *fetus* mit einer internen Positivkontrolle, die auf die 23S rDNA abzielt und mit allen *Campylobacter*-Spezies ein Amplifikat ergibt.

### 3.3 Ergebnisse der Lebensmittelproben

Mit der auf dem *flaA*-Gen basierenden Real-Time PCR nach Anderson (2005) (Methode 9) wurden 178 Lebensmittelproben im Anschluss an die Anreicherung parallel zur Referenzmethode untersucht. 73 Proben ergaben mit beiden Verfahren ein positives Resultat, 93 Proben waren jeweils negativ. 10 Proben waren mit der Referenzmethode negativ und in der PCR positiv. Zwei Proben waren nur mit der Referenzmethode positiv.

Die Überprüfung der DNA der positiven Lebensmittelproben mit der Methode 10 nach Best et al. (2003) bestätigte bis auf eine Ausnahme die Ergebnisse der *flaA*-Real-Time-PCR und auch alle positiven Ergebnisse des kulturellen Verfahrens. Methode 10 ermöglichte die Differenzierung von *C. jejuni* und *C. coli*. Bis auf zwei Ausnahmen konnten damit die Ergebnisse der Differenzierung mittels biochemischer Verfahren im Rahmen der konventionellen Diagnostik bestätigt werden. Dabei wurden 22 Proben (37%) gefunden, die beide Spezies als Mischinfektion beinhalteten, während mittels konventioneller Diagnostik üblicherweise nur ein Isolat weiter diagnostiziert wird.

Des Weiteren wurden mit der Triplex-PCR (Methode 10) 70 Isolate aus Lebensmittelproben parallel zur Routinediagnostik bestimmt. In allen Fällen stimmten die Ergebnisse beider Methoden zur Differenzierung (*C. jejuni* oder *C. coli*) überein. 25 der Anreicherungsproben wurden noch mit den beschriebenen Real-Time PCR-Verfahren 5, 6, 7 und 8 untersucht. Sie lieferten übereinstimmende Ergebnisse. Bei zwei von sechs Proben, die nach konventioneller Diagnostik als negativ galten, konnte noch DNA aus *C. jejuni* detektiert werden.

### 3.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt war die Inklusivität aller getesteter Methoden als sehr gut einzustufen, wobei bei den Real-Time PCR-Systemen doch teilweise nahe verwandte Spezies miterfasst wurden (Tab. 2). Eine Entscheidung, wann die einzelnen Methoden eingesetzt werden sollten, kann – je nach Anwendungsziel – anhand von Tab. 1 und den dargestellten Ergebnissen in Tab. 2 getroffen werden.

Methode 11 (Perelle et al., 2004) ist als Screening für *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* wegen ihrer ausgezeichneten Inklusivität und Exklusivität gut anzuwenden. Das gilt ebenfalls für Methode 10 nach Best et al. (2003), die als Duplex-PCR noch zusätzlich zwischen den Spezies *C. jejuni* und *C. coli* differenzieren kann. Auch Kombinationen aus den auf dem *flaA*-Gen basierenden Methoden (8 oder 9) mit der Spezifität für *C. jejuni* und *C. coli* mit Methode 6 oder 7 (Spezifität ausschließlich *C. jejuni*) sind zu empfehlen. Bei den *flaA*-Real-Time Methoden (8 und 9) macht sich der Polymorphismus zwar immer wieder in der Höhe des Fluoreszenzsignales deutlich, die Reaktionen sind aber trotzdem als positiv zu bewerten.

Bei den konventionellen Methoden ist die PCR-Typisierung nach Nachamkin et al. (1993 und 1996) durchaus für eine

schnelle Stammzuordnung in bestimmten Fällen im Laboralltag nützlich, wenn auch die Auflösung eher als gering einzustufen ist und damit für längerfristige epidemiologische Untersuchungen weniger geeignet erscheint.

Da es sich bei der Real-Time PCR einerseits um ein sehr kontaminationsanfälliges System handelt und *Campylobacter* spp. andererseits Mikroorganismen sind, die eine hohe Intraspezies-Rekombinationsrate und damit eine vergleichsweise hohe Variabilität in der Sequenz bei vielen Zielgenen aufweisen, empfiehlt sich die grundsätzliche Anwendung von zwei Methoden mit unterschiedlichen Zielgenen, um ein höheres Maß an Identifizierungssicherheit zu erlangen.

Die Tendenz bei der Entwicklung von PCR-Methoden geht dahin, solche Zielgene zu finden, die einen möglichst geringen Polymorphismus und wenig Intra-Spezies-Rekombination aufweisen (z. B. Taqman *Campylobacter jejuni* und *coli* Detection Kit von Applied Biosystems). Eine andere wichtige Tendenz ist in der Entwicklung von Multiplex-PCR-Methoden zu sehen, welche die relevanten *Campylobacter*-Spezies gleichzeitig identifizieren können, obwohl dabei ein Verlust in der Sensitivität einhergehen kann.

## 4. Danksagung

Die Autoren danken Frau Petra Vogt und Frau Christiane Dittmar-Gabor für die zuverlässige und sorgfältige Kultivierung von *Campylobacter* spp. sowie den Mitarbeiterinnen des Lebensmittelmikrobiologielabors des LGL Oberschleißheim für die zur Verfügung gestellten Lebensmittelanreicherungen und -isolate.

## 5. Literatur

- Alderton, M. R., Korolik, V., Coloe, P. J., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A. und Frost, J. A. (2003) Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett* 229:237–241.
- Alderton, M. R., Korolik, V., Coloe, P. J., Dewhirst, F. E. und Paster, B. J. (1995) *Campylobacter hyoilei* spec. nov., associated with porcine proliferative enteritis. *Int J Syst Bacteriol* 45:61–66.
- Alm, R. A., Guerry, P. und Trust, T. J. (1993) Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 175:3051–3057.
- Anderson, A., vormalis Wieland (2005) Nachweis von humanpathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mittels moderner molekularbiologischer Untersuchungsverfahren. Abschlussbericht des Projekts P-LS-E / MOP A7-7 am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
- Anderson, A., Pietsch, K., Zucker, R., Mayr, A., Müller-Hohe, E., Mäde, D., Busch, U. und Huber, I. Validation of a duplex Realtime PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *J. Appl. Microbiol.* (eingereicht)
- Ayling, R. D., Woodward, M. J., Evans, S. und Newell, D. G. (1996) Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Res Vet Sci* 60:168–172.
- Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A. und Frost, J. A. (2003) Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett* 229:237–241.

- Birkenhead, D., Hawkey, P. M., Heritage, J., Gascoyne-Binzi, D. M. und Kite, P. (1993) PCR for the detection and typing of campylobacters. *Lett Appl Microbiol* 17:235–237.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. und Colin, P. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* 29:406–410.
- Englen, M. D., Ladely, S. R. und Fedorka-Cray, P. J. (2003) Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. *Methods Mol Biol* 216:109–121.
- Fermer, C. und Engvall, E. O. (1999) Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 37:3370–3373.
- Gonzalez, I., Grant, K. A., Richardson, P. T., Park, S. F. und Collins, M. D. (1997) Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* 35:759–763.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp Ser* 41:95–98.
- Harrington, C. S., Moran, L., Ridley, A. M., Newell, D. G. und Madden, R. H. (2003) Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol* 95:1321–1333.
- Houng, H. S., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D. E. und Pang, L. W. (2001) Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40:11–19.
- Iijima, Y., Asako, N. T., Aihara, M. und Hayashi, K. (2004) Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol* 53:617–622.
- Josefsen, M. H., Jacobsen, N. R. und Hoorfar, J. (2004) Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Appl Environ Microbiol* 70:3588–3592.
- Klena, J. D., Parker, C. T., Knibb, K., Ibbitt, J. C., Devane, P. M., Horn, S. T., Miller, W. G. und Konkel, M. E. (2004) Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol* 42:5549–5557.
- Konkel, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J., Garvis, S. G. und Yoon, J. (1999) Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J Clin Microbiol* 37:510–517.
- Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. und Stanley, J. (1997) PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 35:2568–2572.
- Lübeck, P. S., Cook, N., Wagner, M., Fach, P. und Hoorfar, J. (2003) Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacter* species: validation in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol* 69:5670–5672.
- Menard, A., Dachet, F., Prouzet-Mauleon, V., Oleastro, M. und Megraud, F. (2005) Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to identify the main pathogenic *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Infect* 11:281–287.
- Nachamkin, I., Bohachick, K. und Patton, C. M. (1993) Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 31:1531–1536.
- Nachamkin, I., Ung, H. und Patton, C. M. (1996) Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *J Clin Microbiol* 34:277–281.
- Nicholas, K. B. und Nicholas H. B. Jr. (1997) Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc)
- Nogva, H. K., Bergh, A., Holck, A. und Rudi, K. (2000) Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 66:4029–4036.
- Owen, R. J., Fayos, A., Hernandez, J. und Lastovica, A. (1993) PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis of DNA sequence diversity of flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and allied species. *Mol Cell Probes* 7:471–480.
- On, S. L. W. (2002) International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. Minutes of the meetings, 2 and 4 September 2001, Freiburg, Germany. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2339–2341.
- Oyoyo, B. A., Thornton, S. A., Burr, D. H., Trust, T. J., Pavlovskis, O. R. und Guerry, P. (1992) Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:2613–2619.
- Perelle, S., Josefsen, M., Hoorfar, J., Dilasser, F., Grout, J. und Fach, P. (2004) A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Mol Cell Probes* 18:321–327.
- Persson, S. und Olsen, K. E. (2005) Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol* 54:1043–1047.
- Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. und Ermel, G. (1998) Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J Appl Microbiol* 85:829–838.
- Santesteban, E., Gibson, J. und Owen, R. J. (1996) Flagellin gene profiling of *Campylobacter jejuni* heat-stable serotype 1 and 4 complex. *Res Microbiol* 147:641–649.
- Sekizuka, T., Yokoi, T., Murayama, O., Millar, B. C., Moore, J. und Matsuda, M. (2005) A newly constructed primer pair for the PCR amplification, cloning and sequencing of the flagellin (*flaA*) gene from isolates of urease-negative *Campylobacter lari*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88:113–120.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876–48.
- van de Giessen, A. W., Tilburg, J. J., Ritmeester, W. S. und van der Plas, J. (1998) Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures. *Epidemiol Infect* 121:57–66.
- Vanechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., de Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G. und Kersters, K. (1992) Rapid identification of bacteria of the *Comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett* 72:227–233.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D. L. und Rodgers, F. G. (2002) Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subspec. *fetus*. *J Clin Microbiol* 40:4744–4747.