

Nachweis von *Campylobacter* mittels DNA-DNA-Hybridisierungstechnik = Detection of campylobacter strains using DNA-DNA-hybridization-technique

Autor(en): **Furrer, B. / Aeschbacher, M. / Gerber-Huber, Susanne**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **80 (1989)**

Heft 2

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983602>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Nachweis von *Campylobacter* mittels DNA-DNA-Hybridisierungstechnik

Detection of *Campylobacter* Strains Using
DNA-DNA-Hybridization-Technique

B. Furrer, M. Aeschbacher, Susanne Gerber-Huber*, A. Baumgartner und J. Lüthy
Laboratorium für Lebensmittelchemie, Institut für Biochemie der Universität Bern
und Bundesamt für Gesundheitswesen, Bern

Einleitung

DNA (Deoxyribonukleinsäure)-Hybridisierungsverfahren sind in der klinischen Mikrobiologie, insbesondere für den Nachweis von Viren bei Routineuntersuchungen, bereits weit verbreitet (1–5).

Fortschritte bei den rekombinanten DNA-Techniken (6) eröffnen die Möglichkeit ihrer Anwendung auch in der mikrobiologischen Lebensmittelanalytik (7), vor allem in der Bakteriologie (8–11).

Das Prinzip der DNA-DNA-Hybridisierungstechnik ist in Abbildung 1 festgehalten:

- Isolierung der Nukleinsäuren aus den Bakterienzellen.
- Denaturierung und Fixation der Nukleinsäuren auf Nylon- bzw. Nitrozellulosefiltern.
- Hybridisierung der fixierten Nukleinsäuren mit einer spezifischen, markierten Gensonde. Die Markierung kann mittels eines Radioisotopes erfolgen oder über «kalte» Moleküle wie z. B. Biotin.
- Abwaschen der überschüssigen, nicht hybridisierten Gensonde und Visualisierung der Hybride durch Autoradiographie oder durch eine farbbildende Enzymreaktion bei «kalter», das heisst nicht radioaktiver Markierung.

Mit der Entwicklung von Selektivmedien zur Isolierung von *Campylobacter jejuni* aus Stuhlproben erkannte man, dass es sich bei diesem Mikroorganismus um einen signifikanten, pathogenen Keim handelt. Vor allem in den Entwicklungsländern steht *Campylobacter*, zusammen mit Salmonellen, Shigellen und enterotoxischen *Escherichia coli*, an erster Stelle als Verursacher von Durchfallserkrankungen beim Menschen (12). Als enteroinvasiver Keim verursacht *Campylobac-*

* Vivagen Diagnostics AG, Brunnmattstrasse 39, 3007 Bern

ter Störungen von subklinischen Infektionen bis hin zu schwerwiegenden Dysenterien (13). Als Reservoir für *C. jejuni* spielen vor allem Wildvögel und Nutztiere wie Schweine, Kälber und Geflügel eine wichtige Rolle.

Unter den Lebensmitteln sind vorwiegend Geflügelfleisch, aber auch kontaminiertes Wasser und Milch (mangelhafte Hygiene) eine Campylobacterquelle (14).

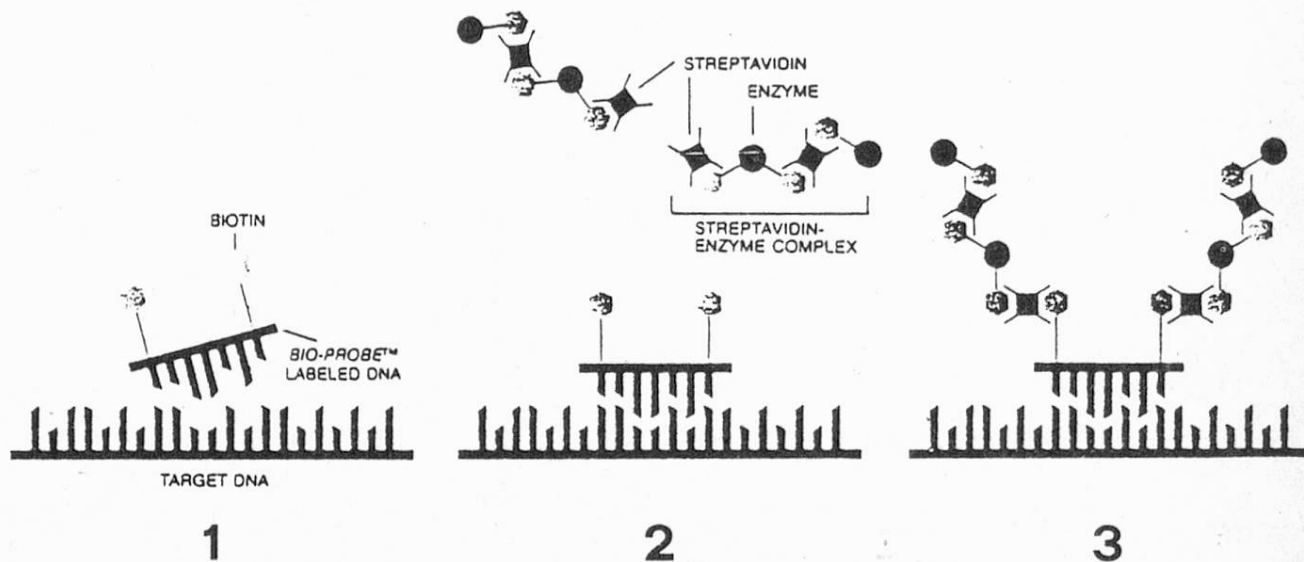


Abb. 1. Prinzip der DNA-DNA-Hybridisierungs-Technik:

- 1 = Hybridisierung der Ziel-DNA-Sequenz mit einer biotinylierten DNA-Probe
- 2 = Komplexbildung mit einem Streptavidin-Phosphatase-Konjugat
- 3 = Visualisierung mit einer farbbildenden enzymatischen Reaktion

Heute bedingt die Isolierung von *C. jejuni* aus Stuhl- oder Lebensmittelproben Inkubationszeiten von bis zu 72 h auf Selektivmedien. Zudem wachsen diese Bakterien in mikroaerophiler Atmosphäre, so dass besondere Einrichtungen für die Kultivierung nötig sind.

Obwohl die konventionellen Techniken (15) eine befriedigende Identifizierung ermöglichen, wären zeitsparendere Methoden zum direkten Nachweis von Campylobacter wünschbar.

In der vorliegenden Arbeit wird die DNA-DNA-Hybridisierungstechnik mittels einer derzeit kommerziell erhältlichen, biotinylierten DNA-Sonde auf ihre Eignung für den Nachweis von Campylobacter geprüft. Eine «kalte», nicht radioaktive Markierung (Biotin) wurde gewählt, da sie punkto Empfindlichkeit einen annähernd ebenbürtigen Ersatz für radioaktive Sonden darstellt. Zudem ist ein spezielles Labor des Typus C nicht notwendig, und Probleme bezüglich Haltbarkeit der markierten DNA-Sonde (Halbwertszeiten der Radioisotope) und Abfallentsorgung fallen weg. Bei der zu prüfenden DNA-Sonde sollen in erster Linie die Spezifität und die Sensivität abgeklärt werden. Zudem untersuchten wir das Testsystem auf Störungen durch Matrixeffekte.

Als Matrix diente ein Geflügelleberhomogenat, welchem diverse Campylobacter-Stämme in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt wurden.

Material und Methoden

Bakterienstämme

15 *C. jejuni*- und 5 *C. coli*-Stämme wurden von *M. Aeschbacher*, Istituto Cantonale Batteriosierologico in Lugano, zur Verfügung gestellt (20).

<i>Campylobacter jejuni</i>		
Nr.	Elektrophorese-Typ nach Aeschbacher	Herkunft der Stämme
01	15	Mensch
02	35	Mensch
03	42	Mensch
04	42	Tier
05	63	Mensch
06	22	Mensch
07	21	Mensch
08	29	Mensch
09	29	Tier
10	64	Mensch
11	47	Mensch
12	47	Tier
13	34	Mensch
14	34	Mensch (nach Indienreise)
15		Toxischer Stamm aus Rochester
<i>Campylobacter coli</i>		
16	01	Mensch
17	01	Mensch
18	03	Mensch
19	03	Tier
20	12	Mensch

Als Negativkontrollen wurden uns der *E. coli*-Stamm JM101 und der Hefestamm GRF 18 freundlicherweise von *Th. Mandel*, Institut für Biochemie und Molekularbiologie in Bern, zur Verfügung gestellt.

Bakterienkultivierung

Die 20 *Campylobacter*-Stämme wurden in einem Transportmedium (Transwab mw 171, Charcoal, medical wire and equipment Co. Ltd., Potley, Torsham,

Wilts, England) geliefert. Pro Stamm wurden auf je 4 Blutplatten Reinkulturen hergestellt. Die Bebrütung der Platten erfolgte in Anaerobentöpfen in mikroaerophiler Atmosphäre (Campy Pack) bei 37 °C während 24 h. Je 2 Platten wurden mit PBS abgeschwemmt und die Bakterienzellen in sterilen Röhrchen (Eppendorf 1,5 ml) bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Zellen der restlichen 2 Platten wurden mit Pulvermilch abgeschwemmt und die Bakteriensuspension in 10% fötalem Kälberserum, 20% Glycerin und 10% Pulvermilch bei -70 °C tiefgefroren und für zukünftige Versuche konserviert.

Zur Bestimmung der Sensitivität des Hybridisierungssystems wurde die Keimzahl im Ausgangsmaterial ermittelt, und zwar diejenige des *Campylobacter jejuni*-Stammes 2 mittels Zählkammerverfahren, diejenige von Stamm Nr. 18 mit dem Oberflächenausstrichverfahren. Die *Campylobacter*-Zellen in den Suspensionen wurden vor dem weiteren Gebrauch mit Formalin inaktiviert.

Zur Erfassung des Einflusses der Lebensmittelmatrix auf das Testsystem wurde ein Geflügelleberhomogenat hergestellt und mit *Campylobacter*-Keimen beimpft:

1. Leber in 2 ml PBS/g mittels Ultraturrax homogenisieren und über einen Wattebausch filtrieren.
2. Homogenate mit *Campylobacter*-Stämmen in unterschiedlichen Konzentrationen beimpfen und im Hybridisierungsexperiment testen.

Lyse der Bakterienzellen

Von allen Keimen (*Campylobacter* 1–20 bzw. verschiedene Verdünnungen der Stämme 2 und 18 sowie *E. coli* und Hefe als Negativkontrollen) wurden 250 µl Keimsuspension mit einer Lysozymlösung (10 mM EDTA, 25 mM TrisHCl, 50 mM Glucose, 100 mg/ml Lysozym, Sigma) auf eine Konzentration von 5 mg/ml Lysozym gebracht und die Ansätze 15 min bei 37 °C zur Zellaufschliessung inkubiert.

Eine Pronaseverdauung zur Freisetzung der DNA erfolgte bei einer Konzentration von 1 mg/ml Pronase (Boehringer, Mannheim), während 1–2 h bei 37 °C.

Aufbereitung der Proben zur Hybridisierung

Folgende Negativkontrollen für die anschließende Hybridisierung wurden mitgeführt:

- Lysozymlösung mit 5 mg/ml Lysozym, ohne Keime
- Pronaselösung mit 1 mg/ml Pronase, ohne Keime
- Hering-Sperm-DNA (Träger-DNA) 0,1 mg/ml in bidest. Wasser, ohne Keime
- PBS mit 2–3 Tropfen Formalin, ohne Keime
- Geflügelleberhomogenat, ohne Keime

Als Positivkontrolle für die Hybridisierung dienten 20 ng (1 µl) der biotinylierten DNA-Sonde (Enzo Biochem, Ortho-Diagnostics).

Zur Denaturierung der DNA (DNA in Einzelstränge getrennt) wurden alle Proben mit 1/10 Volumen 3n NaOH versetzt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Positivkontrolle wurde hitzedenaturiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen 2 m Ammoniumacetat. Anschliessend wurden die Proben sofort filtriert.

DNA-DNA-Hybridisierung

1. Nitrozellulose (Schleicher & Schuell) – bzw. Nylon-Filter (Pall Biodyne A) während 10 min mit Wasser benetzen und danach in Filtriergerät (Manifold ViraPap, Life Technologies, Inc, BRL, GIBCO) einsetzen. Anschliessend Proben auftragen und mittels eines schwachen Vakuums (Wasserstrahlpumpe) auf den Filter bringen.
2. Den Filter mit Pincetten in Plastikbeutel transferieren (beladene Seite nach oben) und mit 5 ml vorgewärmter (42 °C) Vorhybridisierungslösung versetzen. Die in der Vorhybridisierungslösung (50% Formamid, 4 × SSPE, 5 × Denhardt's Lösung, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml Träger-DNA) enthaltene Träger-DNA zur Denaturierung vorgängig 5 min kochen und dann im Eisbad abschrecken. Für die Vorhybridisierung den gleichmässig überfluteten Filter während 1 h bei 42 °C (z. B. im Trockenschrank) inkubieren.
3. Die Vorhybridisierungslösung abdekantieren und den Filter sorgfältig in frische Plastikbeutel transferieren. 2 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung zugeben, Beutel zuschweissen und bei 42 °C über Nacht zwecks Hybridisierung inkubieren. Die Hybridisierungslösung enthält 300 ng/ml biotinylierte *Campylobacter*-Sonde und 100 ng/ml Träger-DNA, die vorgängig während 5 min gekocht und anschliessend im Eisbad abgeschreckt wurden.
4. Plastikbeutel öffnen und Hybridisierungslösung in Sammelgefäss auffangen und tiefrieren, da diese wieder verwertet werden kann. Filter in Petrischale überführen und bei Raumtemperatur 2 × 15 min in 2 × SSC, 0,1% SDS unter leichtem Schütteln waschen. Zwei weitere Waschschrte in gleicher Lösung bei 65 °C vorgewärmt durchführen. Einen weiteren Waschschrte bei 65 °C in 0,5 × SSC, 0,1% SDS während 15 min anschliessen. Letzte Waschung 15 min bei Raumtemperatur in 2 × SSC (ohne SDS!).

Nachweis von DNA-DNA-Hybriden

Absättigen von freien Bindungsstellen

Filter in neue Petrischale transferieren (beladene Seite nach oben) und 30 min mit Abblock-Puffer (1 × PBS, 2% BSA (Sigma), 0,05% Triton X-100, 5 mM EDTA) bei Raumtemperatur absättigen.

Zugabe des Detektionskomplexes (Streptavidin-alk. Phosphatase)

Filter in Plastikbeutel transferieren, Detek I-alk-Komplex (Enzo Biochem, Ortho-Diagnostics) zugeben, Plastikbeutel zuschweissen (Luftblasen vermeiden) und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren.

Waschen

Filter in Petrischale überführen und 5×5 min unter leichtem Schütteln waschen (10 mM $K_3 PO_4$ pH 6,5, 0,5 M NaCl, 0,5% Triton X-100, 1,0 mM EDTA, 2,0% BSA), dann 2×2 min in Praedetektionspuffer (100 mM TrisHCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) in frischer Petrischale waschen.

Detektion

Filter in frischer Petrischale mit der Substrat-Reaktionsmischung (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (BCIP), Nitroblautetrazolium (NBT) in Praedetektionspuffer) im Dunkeln reagieren lassen.

Eine erste Färbung ist nach ca. 10 – 20 min sichtbar. Die Gesamtreaktionszeit beträgt ungefähr 2 h. Nitrozellulosefilter sollten anschliessend im Dunkeln in Wasser aufbewahrt werden, da die Färbung sonst verblasst. Nylonfilter sind diesbezüglich weniger anfällig.

Resultate und Diskussion

Das DNA-DNA-Hybridisierungsverfahren wurde mittels einer kommerziell erhältlichen *Campylobacter jejuni*-Sonde anhand von 20 verschiedenen *Campylobacter*-Stämmen auf die Eignung zu deren Nachweis überprüft. Von besonderem Interesse waren Aussagen über Spezifität, Sensitivität und Lebensmittelmatrixeffekte (Abb. 2).

Reinkulturen im Puffer

Alle untersuchten *Campylobacter*-stämme (15 *C. jejuni* und 5 *C. coli*) ergaben mit der Biosonde positive Signale. Die DNA-Sonde erlaubt also keine Unterscheidung der beiden verschiedenen Spezies. Die Sonde ist aber Genus-spezifisch, denn es wurden keine Kreuzreaktionen mit *Escherichia coli* JM 101, Hefestamm GRF 18 und *Salmonella enteritidis* nachgewiesen. Andere Autoren konnten mit einer offenbar spezifischeren DNA-Sonde *C. jejuni* von anderen *Campylobacter*-Species abgrenzen (17). Roszak et al. (16) und Heinzer et al. (17), welche eine Sonde derselben Firma (Molecular Biosystems, San Diego) benutzten, gelang hingegen das Auseinanderhalten von *C. jejuni* und *C. coli* nicht.

Durch Untersuchung diverser Keimverdünnungen wurde eine Sensitivität von ca. 10^7 Keimen ermittelt, das heisst mit einem Probenvolumen von $250 \mu l$ (4×10^7 Keime/ml) resultierte noch ein eindeutiges Farbsignal (Abb. 2). Diese

Empfindlichkeitsgrenze liegt etwas unter der von *Heinzer et al.* (17) in einem ähnlichen Testsystem ermittelten von $1,2 \times 10^6$ Keimen/ml.

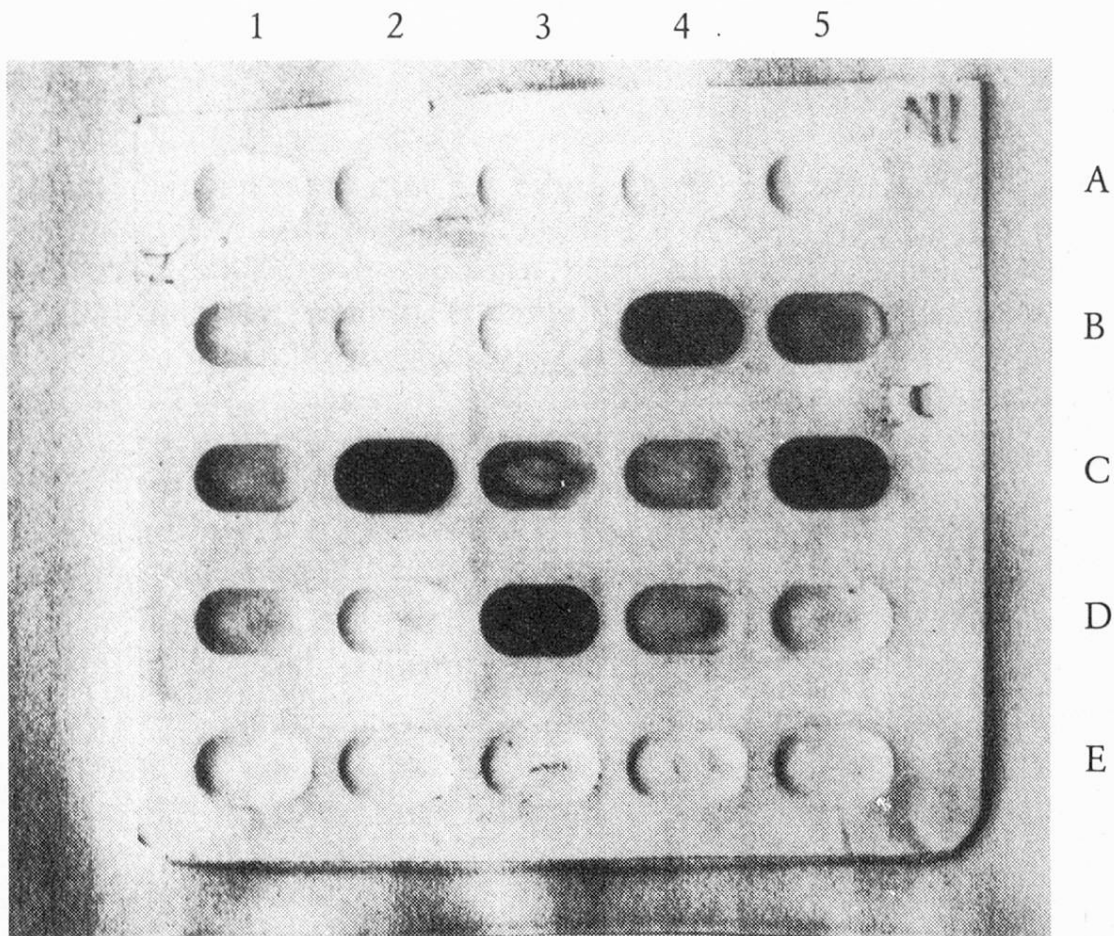


Abb. 2. Nachweis von *Campylobacter jejuni*-DNA auf Nitrozellulose-Membran: Negativkontrollen A1–5 und E1–5 (Hering-Sperm-DNA, *Salmonella enteritidis*, Lysozym-Lösung, Pronase-Lösung, Wasser). B1 Positivkontrolle (10 ng biotinylierte DNA), B2 Hefe GRF 18, B3 *E. coli* JM 101, B4–C1 *Campylobacter jejuni*-Stamm 1 (10^8 , 5×10^7 , 10^7 Keime), C2–C4 Camp.-Stamm 3 (Verdünnungen wie Stamm 1), C5–D2 Stamm 5, D3–D5 Stamm 7

Reinkulturen im Lebensmittelhomogenat

Der Matrixeffekt zeigte sich einzig und allein darin, dass bei einem Bakterienzusatz von mehr als 5×10^7 Keimen die Filter verstopfen können.

Die gemessenen Signale waren, verglichen mit jenen der Reinkulturen im Puffer, bei gleichen Probenmengen stärker. In diesem System konnte eine Nachweisgrenze von 5×10^6 Keimen ermittelt werden. Die Tatsache, dass die Lebensmittelmatrix offenbar verstärkte Signale zur Folge hat, bedeutet, dass Kreuzreaktionen mit Komponenten davon, z. B. Bakterien, nicht ausgeschlossen werden können. Diesem Problem müsste in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

Bei der Verwendung von Nylonmembranen mussten grosse Hintergrundreaktionen, vor allem am Filterrand, in Kauf genommen werden. Als Alternative wurden Nitrozellulosefilter eingesetzt, die dann bezüglich unspezifischer Farbeffekte keine Probleme mehr verursachten.

Nitrozellulosefilter bedürfen allerdings besonderer Sorgfalt bei den Manipulationen mit Pincetten, da sie wesentlich zerbrechlicher sind als solche aus Nylon. Zudem können die Farbreaktionen mit der Zeit verblassen, was in bezug auf die Aufbewahrung nachteilig ist. Es ist jedoch möglich, durch stetige Feuchthaltung der Nitrozellulosemembranen diesem Effekt vorzubeugen.

Bei der Probenfiltration konnte, übereinstimmend mit den Erfahrungen von Roszak et al. (16), eine optimale Auftragsmenge von 10^8 Keimen/Kavität erreicht werden. Mit höheren Mengen riskiert man eine Verstopfung der Filter.

Schlussfolgerungen

Das geprüfte Testsystem erwies sich als relativ materialaufwendig. Ein limitierender Faktor stellt auch der hohe Preis der kommerziellen DNA-Sonde dar. Die Eigenherstellung analoger DNA-Sonden würde einen enormen experimentellen Aufwand bedeuten, müsste doch aus dem Bakteriengenom ein Abschnitt gefunden werden, der sich für die gewünschte, spezifische Hybridisierung überhaupt eignet.

Hybridisierungsexperimente führen in der Regel schnell zu Resultaten. Die geprüfte Methode erlaubt das Aufschliessen der Keime, die Bindung der DNA auf Membranen, die Vorhybridisierung, die Hybridisierung und den Nachweis der DNA-Hybride in ca. 24 Stunden.

Bei der Untersuchung von Lebensmittelproben hingegen bedarf es, wegen der schlechten Nachweisgrenze des Testes von nur 10^7 Keimen/g, vorausgehend einer selektiven Anreicherung der *Campylobacter*. Dieser Schritt ist unabdingbar beim Wissen, dass die minimale infektiöse Dosis einer *Campylobacter*-Infektion mit 500 Keimen sehr tief liegt (18). Ein Anreicherungsschritt steht dem Wunsche eines Schnelltestes somit entgegen.

Im weiteren entspricht die Spezifität nicht den von Picken et al. (12) gemachten Angaben, da die klinisch relevanten Stämme (*C. jejuni* und *C. coli*) nicht unterschieden werden können.

Eine Möglichkeit, die unbefriedigende Sensitivität zu verbessern, bestünde darin, die Technik der Filter-DNA-Hybridisierung durch die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) zu ersetzen (19). Diese Methode amplifiziert ein bestimmtes DNA-Stück (Sonde) im Ausgangsmaterial so effizient, dass es anschliessend mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Ein solches Nachweisverfahren soll nun in unserem Labor entwickelt werden.

Zusammenfassung

Ein kommerziell erhältliches Testsystem zum Nachweis von *Campylobacter* mittels DNA-DNA-Hybridisierung und Streptavidin-Phosphatase als Marker wurde auf praktische Verwendbarkeit überprüft. 15 definierte *Campylobacter jejuni*- und 5 *Campylobacter coli*-Stämme ergaben eine positive Reaktion mit einer allerdings noch unbefriedigenden Nachweisgrenze von ca. $5 \cdot 10^6$ Keimen. Kreuzreaktionen mit anderen getesteten Keimen konnten keine nachgewiesen werden.

Résumé

Une préparation combinée du commerce pour la détection de *Campylobacter* par hybridation DNA-DNA avec, comme marqueur, la streptavidine-phosphatase a été examinée quant à son application pratique. Une réaction positive a été obtenue pour 15 *Campylobacter jejuni* définis et 5 souches de *Campylobacter coli*, la limite de détection d'env. $5 \cdot 10^6$ germes étant toutefois encore insatisfaisante. Aucune réaction croisée avec d'autres germes n'a pu être décelée.

Summary

A commercially available DNA-DNA-hybridisation-test system for the detection of *Campylobacter* with a streptavidin-phosphatase as marker was evaluated on practicability. 15 characterized strains of *Campylobacter jejuni* and 5 *Campylobacter coli* gave a positive reaction although with a not yet satisfying detection limit of $5 \cdot 10^6$ bacterias. No cross reaction with further tested bacterias was found.

Literatur

1. Buffone, G. J., Schimbor, C. M., Demmler, G. J., Wilson, D. R. and Darlington, G. J.: Detection of cytomegalovirus in urine by nonisotopic DNA hybridization. *J. Infect. Dis.* **154**, 163–166 (1986).
2. Forghani, B., Dupuis, K. W. and Schmidt, N. J.: Rapid detection of herpes simplex virus DNA in human brain tissue by in situ hybridization. *J. Clin. Micro.* **22**, 656–658 (1985).
3. Hyypia, T.: Detection of adenovirus in nasopharyngeal specimens by radioactive and nonradioactive DNA probes. *J. Clin. Micro.* **21**, 730–733 (1985).
4. Rijntjes, P. J. M., Van Ditzhuijsen, Th. J. M., Van Loon, A. M., Van Hallst, U. J. G. M., Bronkhorst, F. B. and Yap, S. H.: Hepatitis B Virus DNA detected in formalin-fixed liver specimens and its relation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver disease. *Am. J. Path.* **120**, 411–418 (1985).
5. Unger, E. R., Budgeon, L. R., Myerson, D. and Brigati, D. J.: Viral diagnosis by in situ hybridization. *Am. J. Surg. Path.* **10**, 1–8 (1986).
6. Frank, E. and Young, M. D.: DNA Probes, fruits of the new biotechnology. *JAMA* **258**, no 17 (1987).
7. Baur, Cordula, Teifel-Freding, Johanna und Liebhardt, E.: Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-Analyse. *Arch. Lebensmittelhyg.* **38**, 172–174 (1987).

8. *Fitts, R., Diamond, M., Hamilton, C. and Neri, M.*: DNA-DNA hybridization assay for detection of Salmonella spp. in foods. *Appl. Environm. Microbiol.* **46**, 1146–1151 (1982).
9. *Hill, W. E., Wentz, B. A., Payne, W. L., Jason, J. A. and Zon, G.*: DNA colony hybridization method using synthetic oligonucleotides to detect enterotoxigenic Escherichia coli: collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* **69**, 531–536 (1986).
10. *Notermans, S., Heuvelman, C. J. and Wernars, K.*: Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus strains. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 762–769 (1987).
11. *Rubin, F. A., Kopecko, D. J., Noon, K. F. and Baron, L. S.*: Development of a DNA probe to detect Salmonella typhi. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 600–605 (1985).
12. *Picken, R. N., Wanbg, Z. and Yang, H. L.*: Molecular cloning of a species-specific DNA probe for Campylobacter jejuni. *Molecular and Cellular Probes* **1**, 245–259 (1987).
13. *Walker, R. I., Caldwell, M. B., Lee, E. C., Guerry, P., Trust, T. J. and Ruiz-Palacios, G. M.*: Pathophysiology of Campylobacter enteritidis. *Microbiological Reviews* **50**, 81–94 (1987).
14. *Breer, C.*: Neue Erkenntnisse über die Erreger bakterieller Lebensmittel-Infektionen. Vorträge der 17. Arbeitstagung der Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH), Schriftenreihe Heft 14, 18–30 (1984).
15. Schweiz. Lebensmittelbuch Band V, Kapitel 56, Mikrobiologie. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1985.
16. *Roszak, D. B., Shrawder, E. J., Freier, S. M., Driver, D. A., Bridge, C. L., Cerny D. J. and Schmidt, L. M.*: Rapid testing of diarrheal agents: Non-radioactive DNA probe tests for the direct detection of Campylobacter and Rotavirus in stool. *Molecular Biosystems, Inc.*, San Diego, CA 1988.
17. *Heinzer, I., Limbach, C. und Walther, M.*: Nachweis von Campylobacter mit einer kommerziellen DNS-Probe. Zusammenfassung der Vorträge und Posters, 46. Jahrestagung der Schweiz. Gesellschaft für Mikrobiologie.
18. *Robinson, D. A.*: Infective dose of Campylobacter jejuni in milk. *Brit. Med. J.* **282**, 1584 (1981).
19. *Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, Susanne, Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A.*: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
20. *Aeschbacher, M. and Piffaretti, J.-P.*: Population genetics of human and animal enteric Campylobacter strains. *Infect. Immun.* **57**, 1432–1437 (1989).

B. Furrer und PD Dr. J. Lüthy
 Laboratorium für Lebensmittelchemie
 Institut für Biochemie
 der Universität Bern
 Freiestrasse 3
 CH-3012 Bern