

Amtliche Methode

Campylobacteriose (*thermophile Campylobacter*)

Inhaltsverzeichnis

1.	Charakterisierung der Infektion.....	3
1.1	Erreger	3
1.2	Klinische Symptomatik	3
1.3	Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.4	Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)	4
2.	Untersuchungsmaterial	5
2.1	Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis.....	5
2.2	Beförderung der Proben.....	5
3.	Untersuchungsgang	6
3.1	Erregernachweis	6
3.2	Identifizierung von <i>Campylobacter</i> -Spezies.....	7
3.3	Phänotypische Differenzierung von <i>Campylobacter</i> -Isolaten	8
3.4	Identifikation von Bakterienisolaten mit MALDI-TOF MS	10
3.5	Molekularbiologische Identifizierung von <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Campylobacter coli</i>	11
3.6	Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik	12
	Literatur.....	13
	Anhang.....	15

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Campylobacter (C.) bilden mit den Gattungen *Arcobacter* und *Sulfospirillum* die Familie *Campylobacteraceae* innerhalb der Ordnung der *Campylobacterales* der Epsilon-Proteobakterien. Das Genus *Campylobacter* besteht gegenwärtig aus über 27 Spezies und 7 anerkannten Subspezies. Neben dem mikroaerophilen Metabolismus zeichnen sich *Campylobacter*-Isolate durch die Unfähigkeit, Kohlenhydrate zu verwerten sowie ihren geringen (Guanin + Cytosin)-Gehalt aus.

Campylobacter sind zarte, Gram-negative, spiralig gewundene Stäbchen (0,5 bis 8 µm lang und 0,2 bis 0,5 µm breit), die unter Sauerstoffeinwirkung oder bei Alterung der Kulturen auch kokkoide oder sphäroide Gestalt annehmen können. Sie sind keine Sporenbildner und besitzen in der Regel je eine mono oder bipolar angeordnete Geißel, woraus die Beweglichkeit des Mikroorganismus resultiert. Die Wachstumstemperatur ist ein hilfreiches Differenzierungskriterium. Die Spezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* werden aufgrund ihres Wachstumsoptimums bei 42 °C als thermophile *Campylobacter* bezeichnet.

Campylobacter-Spezies sind ubiquitär verbreitet und kolonisieren die Schleimhäute des Intestinaltrakts, die Mundschleimhaut oder den Urogenitaltrakt bei Tier und Mensch. Verschiedene Spezies sind pathogen und führen zu Erkrankungen sowohl beim Tier als auch beim Menschen. 12 *Campylobacter*-Spezies sind mit humanen Erkrankungen assoziiert. Unter diesen Spezies besitzen die thermophilen *C. jejuni* und *C. coli* als wichtigste Erreger der *Campylobacter*-Enteritis (Campylobacteriose) die größte gesundheitspolitische Bedeutung. Die Campylobacteriose ist eine Zoonose, die im Gegensatz zum Menschen bei Vögeln, Geflügel und vielen Säugetieren meist asymptomatisch verläuft.

1.2 Klinische Symptomatik

Thermophile *Campylobacter* gehören weltweit zu den häufigsten Verursachern bakteriell bedingter Durchfallerkrankungen beim Menschen. Dabei reicht das klinische Spektrum von asymptomatischen Infektionen über wässrige bis zu schweren blutigen Durchfällen. Symptome eines „akuten Abdomens“ werden beobachtet. Die Erkrankung verläuft meist selbstlimitierend, allerdings können Personen, die nicht antibiotisch behandelt worden sind, über zwei bis vier Wochen infektiös sein. Eine Campylobacteriose steht vielfach auch am Beginn der Ausbildung des Guillain-Barré-Syndroms, einer neurodegenerativen Erkrankung. Als Hauptquelle humaner Infektionen gelten Geflügelprodukte, aber auch Rind, Schwein, Hund und Katze stellen ein Keimreservoir dar.

Campylobacter coli wurde bei einer Vielzahl warmblütiger Tiere gefunden und kommt häufig als Kommensale beim Schwein vor. Dieser Mikroorganismus wird beim Menschen mit Gastroenteritis und Septikämie in Verbindung gebracht. Bei Geflügel wird er als Ursache einer hepato-enteralen Erkrankung betrachtet.

Campylobacter jejuni nutzt ein sehr breites Wirtsspektrum. Das Bakterium kommt häufig in verschiedenen Geflügelarten vor, wurde in vielen Säugetierarten festgestellt, aber auch in Insekten. Beim Menschen führt eine Infektion mit *C. jejuni* meist zu einer Gastroenteritis, aber auch Meningitis, Abort oder Proktitis sind

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

beschrieben worden. Beim Nutzgeflügel treten enterale und hepato-enterale Erkrankungsformen auf, bei Säugern wurden zusätzlich Aborte bei verschiedenen Spezies beschrieben.

Campylobacter lari wurde im Intestinaltrakt verschiedener Seevögel, Säugetiere, aber auch in Muscheln nachgewiesen. Es sind keine Beziehungen zu Erkrankungen bei Tieren bekannt. Beim Menschen kann *C. lari* Enteritis und Septikämie verursachen.

Campylobacter upsaliensis wurde bisher bei Hund, Katze, Ente und Mensch nachgewiesen. Die Spezies wird häufiger bei Hunden als bei Katzen nachgewiesen. In beiden Arten kann *C. upsaliensis* eine Gastroenteritis auslösen. Beim Menschen sind die durch *C. upsaliensis* verursachten Erkrankungen Enteritis, Septikämie, Abszess, Abort beschrieben worden.

1.3 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Zuständig für die Untersuchung auf thermophile *Campylobacter* sind die jeweiligen Landesuntersuchungsämter.

Am BfR ist das Nationale Referenzlabor (NRL) für *Campylobacter* etabliert, welches sich vornehmlich mit Untersuchungen von *Campylobacter* im Zusammenhang mit der Lebensmittelproduktion und dem Handel beschäftigt.

Am Friedrich-Loeffler-Institut wurde das Nationale Referenzlabor (NRL) für *Campylobacteriose* (thermophile *Campylobacter*), Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Tel. 03641-804-2249 errichtet (Ansprechpartner: Dr. H. El-Adawy).

Gegenstand der Arbeiten sind u. a.

- Ausarbeitung und Aktualisierung von methodischen Empfehlungen zur Labordiagnostik
- Untersuchungen zur Prävalenz von *Campylobacter* in Tierbeständen
- Untersuchungen zu Virulenzfaktoren thermophiler *Campylobacter*
- Erarbeitung von Kontrollstrategien zur Reduktion der *Campylobacter*-Belastung in Beständen

1.4 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

Campylobacteriosen bei verschiedenen Tierarten, verursacht durch die thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* sind meldepflichtig

- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten
- Richtlinie 2003/99/EG des europäischen Parlaments und des Rates zur Überwachung von Zoonosen und Zoonose-Erregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates.
- Verordnung (EG) 2160/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonose-Erregern in der jeweils gültigen Fassung.

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis

Als Untersuchungsmaterial finden neben kultivierten Bakterienkulturen auch Materialien wie Wasser, Milch, Kotproben, Leber- oder Zäkumproben, Futterproben und Fleisch- oder Kloakentupfer Verwendung.

Die Proben sind so bald wie möglich in Kultur zu bringen:

- Untersuchung von Kot und Kottupfern von gesundem und krankem Geflügel, Wildvögeln, Hunden und Katzen.
- Im Schlachthof Entnahme von Leber- und Zäkumproben unter sterilen Kautelen.
- Es ist bekannt, dass *Campylobacter* in Rohmilch relativ kurz überlebt bzw. in einem kultivierbaren Zustand bleibt. Das ist bei bestimmten Fragestellungen, wie z.B. der Ausbruchsabklärung, auch die Zeit zwischen Milchgewinnung, Probennahme und Untersuchung, als wesentliche Faktoren zu berücksichtigen.
- Neben Geflügelfleisch wurde durch diverse Lebensmittel-Überwachungsaktionen auch Rind- und Schweinefleisch untersucht.
- Untersuchung von Futtermittelproben (für Geflügel, Milchvieh, Schweine, kleine Wiederkäuer) auf *Campylobacter*.
- Untersuchung von Wasserproben (Tränke, Abwasser).

2.2 Beförderung der Proben

Wegen der Empfindlichkeit der *Campylobacter* gegenüber Sauerstoff sollten für den Transport spezielle Transport-Medien verwendet werden (z.B. Amies Agar Gel with Charcoal).

Den entsprechenden Teil des Präanalytikhandbuches finden Sie hier: <https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IBIZ/ALA-Campylobacteriose-20150306.pdf> Bitte füllen Sie einen Einsendebogen für Campylobacteriose aus, wenn Sie Proben an das FLI bzw. NRL senden: <https://fms.fli.de/lip/form/display.do?%24context=DC31948526DAAC6CFCF9>

3. Untersuchungsgang

3.1 Erregernachweis

Der Erregernachweis aus den unterschiedlichen Ausgangsmatrizen erfolgt nach den Festlegungen von ISO 10272-1: 2017 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren und Teil 2 Koloniezählverfahren (Deutsche Fassung EN ISO 10272-1:2017)“. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

- Proben aus der Primärproduktion (z.B. Tierkot, Staub, Tupfer) wurden neben Produkten, die für die menschliche Ernährung oder als Tierfutter Verwendung finden, in den Anwendungsbereich aufgenommen;
 - das Nachweisverfahren wurde erweitert, um Probleme mit der Begleitflora zu lösen; Preston-Bouillon wurde als zweites Anreicherungsmedium in das Verfahren aufgenommen;
 - die Möglichkeit des direkten Ausplattierens auf mCCDA-Platten wurde in das Nachweisverfahren aufgenommen;
 - die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde dem Anhang hinzugefügt;
- Alle Einzelheiten sind in der ISO 10272-1:2017 beschrieben.

Probenvorbereitung

Die Leber- und Zäkumproben, Milch, Futterproben und Fleisch werden in sterilen Probenbeuteln gewogen, mit der 9-fachen Menge Phosphatpuffer versetzt und in einem Beutelwalkmischer (Stomacher) homogenisiert.

Danach sind parallel jeweils 0,2 ml auf mCCDA- und modifiziertem Skirrow-Medium aufzutropfen und die Platten 48 h bei 37 °C mikroaerob (85 % N₂, 10 % CO₂, 5 % O₂) zu inkubieren.

- Anreicherung in selektivem Flüssigmedium

- a) für Proben, bei denen eine geringe Anzahl *Campylobacter* und eine geringe Menge an Begleitflora erwartet wird und für solche mit gestressten *Campylobacter* (z.B. gekochte oder gefrorene Produkte, Kulturen aus Transportmedium). Die Prüfmenge wird dem flüssigen Bolton-Anreicherungsmedium steril im Verhältnis 1 : 10 hinzugefügt. Die Probe wird gut homogenisiert (2 min im Stomacher oder mit Vortexer). Anschließend wird die Probe in mikroaerober Atmosphäre 4 bis 6 h bei 37 °C und anschließend 44 ± 4 h bei 41,5 °C bebrütet.
- b) für Proben, bei denen eine geringe Anzahl *Campylobacter* und eine starke Begleitflora erwartet wird (z.B. rohes Fleisch, einschließlich Geflügel, Rohmilch). Die Prüfmenge wird dem flüssigen Preston-Anreicherungsmedium steril im Verhältnis 1 : 10 hinzugefügt. Die Probe wird gut homogenisiert (2 min im Stomacher oder mit Vortexer). Anschließend wird die Probe in mikroaerober Atmosphäre 24 ± 2 h bei 41,5 °C bebrütet.

- Isolierung auf selektiven festen Medien

- a) Die Anreicherungskulturen werden auf das selektive feste Medium mCCD-Agar überimpft und Vereinzelungsausrüche durchgeführt. Es besteht die Möglichkeit, zusätzlich ein zweites selektives festes Medium zu verwenden, bei dem andere selektive Prinzipien, als bei mCCD-Agar, genutzt werden

(z.B. Skirrow-Agar). Die Agarplatten werden bei 41,5 °C in mikroaerober Atmosphäre bebrütet und nach 44 ± 4 h auf *Campylobacter*-verdächtige Kolonien untersucht.

- b) für Proben, bei denen eine hohe Anzahl *Campylobacter* erwartet wird (z.B. Kot, Blinddarminhalt von Geflügel, Kulturen aus Transportmedium). Das Probenmaterial wird direkt auf einer mCCD-Agarplatte ausgestrichen. Es besteht die Möglichkeit, zusätzlich ein zweites selektives festes Medium zu verwenden, bei dem andere selektive Prinzipien, als bei mCCD-Agar, genutzt werden (z.B. Skirrow-Agar). Die Agarplatten werden bei 41,5 °C in mikroaerober Atmosphäre bebrütet und nach 44 ± 4 h auf *Campylobacter*-verdächtige Kolonien untersucht.

Anschließend werden die *Campylobacter*-Isolate phänotypisch und molekularbiologisch charakterisiert.

In den meisten konventionellen biochemischen Tests sind *Campylobacter* relativ inaktiv und es gibt keine geeigneten Methoden, die eine einfache Differenzierung aller Spezies ermöglichen. Die Tests zur Differenzierung sind bisher nur teilweise standardisiert und in der Literatur weit verstreut (On, 1996). Methodische Hinweise zur Durchführung und Bewertung der Reaktionen finden sich bei Lander, Gill (1985) sowie Nachamkin (1999). Die Anwendbarkeit kommerzieller Differenzierungssysteme (z.B. API Campy, bioMérieux) wird unterschiedlich bewertet. Diese Systeme erreichen nicht die Aussagekraft konventioneller Tests.

3.2 Identifizierung von *Campylobacter*-Spezies

Wuchsformen

In der Primärkultur wachsen *Campylobacter* sp. nach 2- bis 5-tägiger Inkubation - beeinflusst durch die Feuchtigkeit des Nährmediums - in zwei Wuchsformen als flache, grau glänzende Kultur mit Neigung zum Schwärmen und Zusammenfließen oder als runde, konvexe, glatte, glänzende Einzelkolonien von 1 bis 3 mm Durchmesser. Auf Blutagar ist keine Hämolyse nachweisbar.

Oxidase-Reaktion

Es stehen handelsübliche Oxidase-Teststreifen zur Verfügung, z.B. Bactident Oxidase-Test-Strips. *Campylobacter*-Spezies reagieren positiv. Bei positiver Reaktion verfärbt sich das Koloniematerial in 5 bis 10 Sek ultramarinblau.

Nativpräparat

Campylobacter sp. sind beweglich und zeigen im Phasenkontrastmikroskop eine typische, „schießende“ Beweglichkeit, die bei Subkultivierung verloren gehen kann.

Gram-Färbung

Im Gram-Präparat handelt es sich um gramnegative, dünne, gebogene Stäbchen, 0,3 bis 0,4 µm breit und 0,5 bis 8,0 µm lang. Gleichzeitig können kurze Formen (kommaförmig), mittlere Formen (S-förmig) und lange Formen (spiralförmig mit mehreren Windungen) in einer Kultur beobachtet werden.

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

3.3 Phänotypische Differenzierung von *Campylobacter*-Isolaten

Da *Campylobacter* spp. anspruchsvolle Keime sind, können bereits geringfügige Änderungen der Medienzusammensetzung die Differenzierungsergebnisse beeinflussen. Es müssen daher Kontrollstämme entsprechender Spezies parallel mitgeführt werden (Tab. 1). Die wichtigsten kulturellen und biochemischen Merkmale von *Campylobacter*-Arten zeigt Tabelle 2.

Katalase-Probe

Auf einen Objektträger wird ein Tropfen einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung gegeben und in diesem mit der Öse Koloniematerial verrieben. Bei positiver Reaktion tritt nach wenigen Sekunden eine starke Bläschenbildung ein.

H₂S-Nachweis

Triple-Sugar-Iron (TSI)-Agar wird mit 48 Stunden altem Kulturmaterial beimpft und 2 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet. Die positive Reaktion führt zu einer Schwärzung des Agar.

Natrium-Selenit-Reduktion

Nährbouillon (z.B. Nr. 2 von Oxoid) mit Zusatz von 0,1 % Natriumselenit wird mit Kulturmaterial beimpft und 4 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet. Jede noch so geringgradige Rotfärbung gilt als positive Reaktion.

Kochsalztoleranz

Thioglykolatbouillon oder Blutagar, jeweils mit einem Gehalt von 3,5 % NaCl, werden mit Kulturmaterial beimpft, 3 bis 4 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet und auf Wachstum (Trübung) kontrolliert.

Glycintoleranz

Thioglykolatbouillon oder Blutagar, jeweils mit einem Gehalt von 1 % Glycin, werden mit Kulturmaterial beimpft, 3 bis 4 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet und auf Wachstum (Trübung) kontrolliert.

Nalidixinsäure-Resistenz

Der Test wird in der üblichen Weise auf Mueller-Hinton-Agar mit Nalidixinsäure-Testblättchen (30 µg) angesetzt und nach 4 Tagen mikroaerober Inkubation bei 37 °C abgelesen. Eine Hemmzone von wenigstens 3 mm um das Testblättchen zeigt, dass der Stamm sensitiv ist. Auf Grund der ansteigenden Quinolonresistenz bei *C. jejuni* und *C. coli* ist die Aussagekraft dieser Reaktion stark eingeschränkt.

Cephalotin-Resistenz

Der Test wird mit Cephalotin-Testblättchen (30 µg) in Analogie zur Prüfung auf Nalidixinsäure-Resistenz angesetzt und ausgewertet.

Hippurat-Hydrolyse

Die Bakterienkultur wird mittels vergleichbaren Kit (z.B. MAST® CAMP-ID IDENTIFICATION SYSTEM (Mast Group Ltd; Art. Nr.: 184001)) nach Protokoll des Herstellers identifiziert. Für die Durchführung dieser Reaktion sind zahlreiche Modifikationen beschrieben. Zur Bewertung der Reaktion ist es erforderlich, einen positiven (*C. jejuni*) und negativen Kontrollstamm (*C. coli*) mitzuführen. Folgendes Vorgehen hat sich bewährt: Ein Filterpapierstreifen wird mit 1%iger, frischer Natriumhippuratlösung getränkt (Lösung kann portioniert werden und ist bei -18 °C sechs Monate haltbar). Die zu differenzierenden Isolate werden in Abständen von 2 bis 3 cm knöpfchenförmig auf die Papieroberfläche aufgerieben. Nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C in der feuchten Kammer werden einige Tropfen 3,5%iger frischer Ninhydrinlösung aufgetragen und die Reaktion nach 15- bis 45-minütiger Einwirkzeit - in Abhängigkeit von der Färbung der Negativkontrolle - abgelesen (Ninhydrin-Reagens: 350 mg Ninhydrin in 10 ml Aceton-Butanol-Mischung 1 : 1). Die positive Reaktion ist durch eine Dunkelpurpurverfärbung der Bakterien und des Papiers um die aufgetragene Probe herum gekennzeichnet (Hofbildung). Die Negativkontrolle zeigt eine schmutzig graue Färbung ohne Hofbildung.

Indoxylazetat-Hydrolyse

Die Bakterienkultur wird mittels vergleichbaren Kit (z.B. MAST® CAMP-ID IDENTIFICATION SYSTEM (Mast Group Ltd; Art. Nr.: 184001)) nach Protokoll des Herstellers identifiziert. Es wird eine 10%ige Indoxylazetatlösung in Azeton hergestellt, auf Teststreifen gegeben, Koloniematerial aufgebracht und ein Tropfen steriles Aqua dest. zugegeben. Die positive Reaktion zeigt sich nach 5 bis 10 Minuten als tiefblaue Färbung.

Temperaturtoleranz

Die Prüfung kann auf Blutplatten oder in Bouillonkulturen erfolgen. Es ist 2 Tage (42 °C) bzw. 5 Tage (25 °C) mikroaerob im Brutkühlschrank zu inkubieren und das Wachstum zu kontrollieren.

Tabelle 1: *Campylobacter*-Typ und -Referenzstämme

Spezies	Typ/Ref.	Herkunft
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	Typ	NCTC 010354
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	Typ	DSMZ 5361
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i> (alte Bezeichnung: Biovar <i>bubulus</i>)	Typ	DSMZ 5363
<i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>	Ref.	NCTC 011415
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	Typ	DSMZ 4688
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	Typ	NCTC 011951
<i>C. coli</i>	Typ	DSMZ 4689
<i>C. lari</i>	Typ	DSMZ 11375
<i>C. upsaliensis</i>	Typ	DSMZ 5365
<i>C. helveticus</i>	Typ	NCTC 012470

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

Tabelle 2: Kulturelle und biochemische Merkmale von *Campylobacter* spp. (Nachamkin, 1999; Vandamme, De Ley, 1991; Ursing *et al.*, 1994; On *et al.*, 1998)

Spezies	Katalase	Reduktion		H ₂ S (TSI)	Na-Selenit-Reduktion	Hydrolyse		Toleranz gegen		Resistenz gegen		Wachstum		H ₂ erforderlich
		Nitrat	Nitrit			Hippurat	Indoxyl-azetat	Kochsalz 3,5%	Glycin 1%	Nalidixin-Säure	Cephalothin	25 °C	42 °C	
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	S	R	-	+	-
ssp. <i>doylei</i>	V	-	-	-	-	V	+	-	+	S	S	-	-	-
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	+	S	R	-	+	-
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	R	R	-	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	-/±	+	-	-	-	-	+	-	V	S	S	-	+	-
<i>C. helveticus</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	S	S	-	+	-
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	R	S	+	-	-
ssp. <i>venerealis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	+	-	-
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	-	+	+	+	+	-	-	V	+	R/S	S	±	+	-
biovar <i>fecalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	V	+	R	S	±	+	-
biovar <i>paraureolyticus</i> ¹⁾	-	+/V	-	+/V	-	-	-	-	+	R	R/V	-	-	-
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	R	S	+	+	V
<i>C. concisus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	R	R	-	-	+
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	R	S	-	+	+
<i>C. curvus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	S	-	-	+	+
<i>C. rectus</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	+	S	-	-	±	+
<i>C. showae</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	V	R	S	-	+	+

V = variabel, unterschiedliche Reaktion

± = schwache Reaktion

TSI = Triple-Sugar-Iron-Agar

3.4 Identifikation von Bakterienisolaten mit MALDI-TOF MS

Campylobacter-Isolate können mit MALDI-TOF MS identifiziert werden, wenn entsprechende Referenzspektren in der Datenbank vorhanden sind. Die Präparation erfolgt mit dem Ethanol-Extraktionsverfahren (entsprechend dem Protokoll der Fa. Bruker Daltonics). Nach 20 min in Ethanol sind die *Campylobacter* abgetötet und die übliche Präparation kann gefahrlos erfolgen. Das Picken und das direkte Auftragen der Kolonien auf das Target werden nicht empfohlen.

3.5 Molekularbiologische Identifizierung von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*

Zur molekularbiologischen Identifizierung von *Campylobacter* spp., *C. jejuni* und *C. coli* hat sich eine konventionelle Multiplex-PCR bewährt (Denis *et al.*, 2001; El-Adawy *et al.*, 2012).

Ausgangsmaterial können *Campylobacter*-Kulturen, aber auch Milch- oder Kotproben sein.

Liegt eine ausreichend abgegrenzte Einzelkolonie auf mCCDA vor, kann aus diesem Material DNA extrahiert werden. Zur Sicherung der Kultur wird gleichzeitig eine Subkultur derselben Kolonie auf nicht selektivem Blut-Agar (z. B. Mueller-Hinton mit 10 % Rinderblut) durchgeführt. Es wird bei mikroaeroben Bedingungen 44 ± 4 h bei $41,5^\circ\text{C}$ bebrütet.

Alternativ kann Material der Subkultur auf nicht selektivem Blut-Agar (z. B. Mueller-Hinton mit 10 % Rinderblut) zur DNA-Extraktion eingesetzt werden.

Im ersten Schritt wird die *Campylobacter*-DNA durch Extraktion mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits nach Angaben der Hersteller gewonnen.

Die konventionelle Multiplex-PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Pro 50 µl-Ansatz werden die folgenden Lösungen als Mastermix (Tabelle 3) in der beschriebenen Reihenfolge eingesetzt. Die Mengen gelten für den Einsatz von 1 µl Template einer DNA-Extrakt-Konzentration von ca. 100 ng/µl. (Bei geringerer DNA-Ausbeute der Extraktion können 2 bis 5 µl eingesetzt werden; entsprechend weniger Wasser ist zu verwenden.)

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix zur Verwendung in der Multiplex-PCR

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
steriles Wasser	ad 45 - 49 µl	
PCR-Pufferlösung (10-fach), enthaltend $c = 15\text{mmol/l MgCl}_2$	5 µl	PCR-Puffer einfach, enthaltend $c = 1,5\text{ mmol/l MgCl}_2$
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 µl	je 200 µmol/l
Primer MD 16S1/S2	je 1 µl	0,125 µmol/l
Primer MD mapA1 /A2 MD COL2/COL3	je 1 µl	0,5 µmol/l
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl	1 U pro Reaktionsansatz

Zum Ausschluss einer PCR-Inhibition sind externe Amplifikationskontrollen (DNA der Typstämme *C. jejuni* DSMZ 4688 und *C. coli* DSMZ 4689) mitzuführen. Tabelle 4 gibt Details zum PCR-Assay.

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

Tabelle 4: Target-Gene und Primer-Sequenzen der Multiplex-PCR

Target	Primer	Primersequenz (5´ - 3´)	Amplikon	Spezifität
16SrRNA	MD16S1	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC	857 bp	Genus <i>Campylobacter</i>
	MD16S2	GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T		
<i>mapA</i>	MDmapA1	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	589 bp	<i>C. jejuni</i>
	MDmapA2	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A		
<i>ceuE</i>	COL 3	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG	462 bp	<i>C. coli</i>
	MDCOL2	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG		

Folgendes Temperatur-Zeit-Programm wird für die Multiplex-PCR verwendet:

Initiale Denaturierung der DNA	60 Sek.	bei 95 °C
35-maliger Durchlauf des folgenden Zyklus	30 Sek	bei 95 °C (Denaturierung)
	90 Sek	bei 59 °C (Annealing)
	60 Sek	bei 72 °C (Elongation)
abschließende Elongation	5 min.	bei 72 °C

Die PCR-Produkte werden auf einem 1,5%igem Agarose-Gel charakterisiert.

C. jejuni und *C. coli* gelten als identifiziert, wenn in der PCR das genuspezifische Amplikon (857 bp) und das speziesspezifische Amplifikat (589 bp für *C. jejuni* bzw. 462 bp für *C. coli*) detektiert werden.

Für alle thermophilen *Campylobacter*-Arten sind in der Literatur spezifische und „real-time“-PCRs beschrieben. Diese Methoden wurden allerdings vom NRL für Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*) nicht validiert.

Der Nachweis von thermophilen *Campylobacter*-Spezies in Hackfleisch mittels „real-time“-PCR-Verfahren ist in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB unter L 06.32-1 (2013-08) veröffentlicht (Anonymous 2013).

3.6 Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender bioinformatischer Datenanalyse ist in vielen Ländern bereits Standard bei der Isolat-basierten Feintypisierung, für Ausbruchsanalysen und zur phänotypischen Charakterisierung von *Campylobacter jejuni*. Während Sequenzierung mittels Verfahren der zweiten Generation

(next generation sequencing) etabliert ist, befinden sich Verfahren der dritten Generation in der Validierungsphase. DNS-Isolation und Erstellung von Libraries sollten nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Die Datenanalyse beginnt mit einer Qualitätskontrolle. Dabei sollten 80 % der Basen einer Probe einen Qualitätswert (Phred Score) von mindestens 30 aufweisen. Quantitativ sollte eine Coverage von mindestens 30 angestrebt werden, wobei mindestens 70 % der Reads taxonomisch dem Genus *Campylobacter* zugeordnet werden sollten. In der Datenanalyse folgt nun meist die Assemblierung der Reads zur Vorhersage von Contigs. Die assemblierten Genome sollten eine Größe von 1,4 bis 1,7 mB und einen N50-Wert von 15 kB aufweisen. Basierend auf den assemblierten Genomen können genetische Faktoren für Resistenz gegen Antibiotika, Virulenz und mobile genetische Elemente mit entsprechenden Datenbanken detektiert werden (z.B. AMR-FinderPlus, VFDB, Plasmidfinder). Zur Typisierung ist das klassische MLST (7 Gene), basierend auf der Genomsequenz, möglich. Hochauflösende Phylogenie ist durch die Bestimmung von Einzelnukleotidänderungen (SNPs) möglich. Außerdem haben sich Verfahren basierend auf Kerngenom-MLST etabliert. Hier bietet sich die kostenfreie Software chewiesnake (Deneke *et al.*, 2021) oder die lizenzierte Software Ridom SeqSphere+ (Jünemann *et al.*, 2013) an. Eine Linux-basierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten für *Campylobacter jejuni* ist kostenfrei verfügbar: https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC

Literatur

- Anonymous (2013): Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis von *Campylobacter* spp. in Hackfleisch - real-time PCR-Verfahren. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB L 06.32-1. Methodensammlung BVL Online, Beuth Verlag GmbH, Berlin. www.methodensammlung-bvl.de
- Deneke C, Uelze L, Brendebach H, Tausch SH, Malorny B (2021). Decentralized Investigation of Bacterial Outbreaks Based on Hashed cgMLST. *Front Microbiol.* 12:649517. doi: 10.3389/fmicb.2021.649517
- Denis M, Refrégier-Petton J, Laisney M J, Ermel G, Salvat G (2001). *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 91(2):255-67. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01380.x.
- DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (2017): Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren und Teil 2 Koloniezählverfahren (EN ISO 10272-1 bzw. 2:2017). Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- El-Adawy H, Hotzel H, Tomaso H, Neubauer H, Hafez H M (2012). Elucidation of colonization time and prevalence of thermophilic *Campylobacter* species during turkey rearing using multiplex polymerase chain reaction. *Poult. Sci.* 91(2):454-9. doi: 10.3382/ps.2010-01810.
- Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, Mellmann A, Goesmann A, von Haeseler A, Stoye J, and Harmsen D (2013). Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat. Biotechnol.* 31: 294-6: 294-6.
- Lander K P, Gill KPW (1985). *Campylobacters*. In: C. H. Collins and J. H. Grande (eds.). Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance. London, Acad. Press. p. 123-142.

Anhang

1. mCCDA-Selektivnährboden, blutfrei:

<u>Campylobacter- Blood-Free Selective Agar-Basis</u> (z.B. CM0739B, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK)	
Zusammensetzung	g/l
Nährbouillon Nr. 2, CM 67	25,0
Bakteriologische Kohle	4,0
Casein-Hydrolysat	3,0
Natriumdesoxycholat	1,0
Eisen(II)-sulfat	0,25
Natriumpyruvat	0,25
Agar	12,0
pH 7,4 ± 0,2	
<u>CCDA-Selektiv-Supplement</u> (SR0155E, Oxoid): Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500ml):	
Cefoperazon	16,0 mg
Amphotericin B	5,0 mg
<u>Zubereitung</u>	
45,5 g Campylobacter-Agar-Basis, blutfrei in 1000 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 min bei 121 °C autoklavieren und auf 50 °C abkühlen. Den Inhalt von 2 Röhrchen CCDA-Selektiv-Supplement aseptisch in 10 ml sterilem Aqua dest. lösen. Jeweils 2 ml der Lösung aseptisch zu 200 ml abgekühlter <i>Campylobacter</i> -Agar-Basis, blutfrei, geben. Gut mischen und Platten gießen.	
<u>Lagerung und Haltbarkeit</u>	
Trockennährboden:	fest verschlossen, lichtgeschützt 10-25 °C
Supplement:	2-8 °C
Haltbarkeit:	s. Etikett
Gebrauchsfertige Platten:	2-8 °C bis zu zwei Wochen

2. Modifiziertes Skirrow-Medium:

<u>Campylobacter-Agar-Basis</u> (CM0689B, Oxoid):	
Zusammensetzung	g/l
Fleischextrakt "Lab-Lemco"	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
Agar	12,0

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

pH 7,5 ± 0,2	
<i>Campylobacter</i> -Selektiv-Supplement Skirrow (SR0069E, Oxoid): Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500ml):	
Vancomycin	5,0 mg
Polymyxin B	1250 I. E.
Trimethoprim	2,5 mg
Weiterhin Zusatz von 30 µg/ml Cefoperazon (Sigma C-4292) und 10 µg/ml Amphotericin B (ICN Biomedicals 1-800-854-0530) s. Zubereitung.	
Steriles lysiertes Pferdeblut: z.B. Oxoid (Art. Nr. SR0048C)	
<u>Zubereitung</u>	
37 g <i>Campylobacter</i> -Agar-Basis in 1000 ml Aqua dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. 15 min bei 121 °C autoklavieren und auf 50 °C abkühlen. Den Inhalt von 2 Röhrchen Selektiv-Supplement Skirrow, 30 mg Cefoperazon und 10 mg Amphotericin B aseptisch jeweils in 10 ml Aqua dest. lösen. 2 ml jeder Lösung aseptisch zu 200 ml abgekühlter <i>Campylobacter</i> -Agar-Basis geben. Zusatz von 10 % sterilem lysierten Pferdeblut (SR0048) Kälberblut. Gut mischen und Platten gießen.	
<u>Lagerung und Haltbarkeit</u>	s. mCCDA-Medium

3. Karmali-Agar

<i>Campylobacter</i> Agar Base (Karmali); Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, United United Kingdom (CM0935)	
Zusammensetzung	g/l
Columbia-Agar Grundmedium	39,0
Aktivkohle	4,0
Hämin	0,032
pH 7,5 ± 0,2 bei 25 °C	
<i>Campylobacter</i> Selective Supplement (SR0167) (Karmali) (Oxoid) Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 1000 ml):	
Natriumpyruvat	100,0 mg
Cefoperazon	32,0 mg
Vancomycin	20,0 mg
Cycloheximid	100,0 mg
<u>Zubereitung</u>	
Herstellerangaben beachten!	
<u>Lagerung und Haltbarkeit</u>	s. mCCDA-Medium

3. **Mueller-Hinton mit 10 % Rinderblut**

Mueller-Hinton Agar Base; z.B. Sifin: LOT:7260819	
Zusammensetzung	g/l
Caseinhydrolysat	17,5
Rindfleisch getrocknete Infusion aus 300 g	2,0
Stärke	1,5
Agar	17,0
destilliertes Wasser	1000 ml
pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C	
steriles Rinderblut	50 ml
<u>Zubereitung</u>	
Die Grundbestandteile bzw. das vollständige Trockengrundmedium unter Erwärmen im destillierten Wasser lösen. Anschließend den pH-Wert prüfen und ggf. einstellen. 15 min bei 121 °C autoklavieren.	
Zu dem auf 44 °C bis 47 °C abgekühlten Grundmedium wird steril das Rinderblut gegeben und gemischt. Anschließend die Platten gießen.	
Aufbewahrung: im Dunkeln bei 5 °C (Platten zuvor nicht trocknen) bzw. laut Herstellerangaben	
Verwendbarkeit: 8 Wochen bzw. laut Herstellerangaben	

4. **Columbia-Agar mit 5 % Schafblut**

Columbia Blood Agar Base; (CM0331) (Oxoid)	
Zusammensetzung	g/l
Tierisches Gewebe, enzymatisch verdaut	23,0
Stärke, löslich	1,0
Natriumchlorid	5,0
Agar: bis 18,0 g, in Abhängigkeit von der Gelierfähigkeit des Agars	8,0
destilliertes Wasser	1000 ml
pH 7,4±0,2 bei 25 °C	
steriles Schafblut	50 ml
<u>Zubereitung</u>	
Die Grundbestandteile bzw. das vollständige Trockengrundmedium unter Erwärmen im destillierten Wasser lösen. Anschließend den pH-Wert prüfen und gegebenenfalls einstellen. 15 min bei 121 °C autoklavieren.	
Zu dem auf 44 °C bis 47 °C abgekühlten Grundmedium wird steril das Schafblut gegeben und gemischt. Anschließend die Platten gießen.	
Aufbewahrung: im Dunkeln bei 5 °C (Platten zuvor nicht trocknen) bzw. laut Herstellerangaben	
Verwendbarkeit: 4 Wochen bzw. laut Herstellerangaben	

Campylobacteriose (thermophile *Campylobacter*)

4. Amies Agar Gel

zum Transport von Reinkulturen

- Amies-Agargel z.B. OXOID (10 x 50 Art. Nr.: TS0001A)
- Amies-Agargel mit Aktivkohle z.B. OXOID (10 x 50 Art. Nr.: TS0002A)

Herstellerangaben beachten! Bei -2 bis 25 °C lagern

5. Bolton-Bouillon

Bolton Broth (CM0983B) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom)	
Zusammensetzung	g/l
Tierisches Gewebe, enzymatisch verdaut	10,0
Lactalbuminhydrolysat	5,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumpyruvat	0,5
Natriumdisulfit	0,5
Natriumcarbonat, wasserfrei	0,6
A-Ketoglutarsäure, Monokalium-Salz	1,0
Hämin (gelöst in 0,1 % Natriumhydroxid)	0,01
destilliertes Wasser	945
pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C	
steriles lysiertes Pferdeblut: z. B. Laked Horse Blood; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK (SR0048C)	50 ml
antibiotische Lösung: z.B. Modified Bolton Broth Selective Supplement; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK (SR0208E)	
Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml):	
Cefoperazon-Natriumsalz	10,0 mg
Vancomycin-Hydrochlorid	10,0 mg
Trimethoprimlactat-Salz	10,0 mg
Amphotericin B	5,0 mg
Ethanol/steriles destilliertes Wasser 50/50 Volumenanteil	
Zubereitung	
Die Bestandteile der antibiotischen Lösung in der angegebenen Mischung von Ethanol und sterilem destilliertem Wasser lösen.	
Die Grundbestandteile bzw. das vollständige Trockengrundmedium, bei Bedarf durch Erwärmung, im destillierten Wasser lösen. Anschließend den pH-Wert prüfen und gegebenenfalls einstellen. 15 min bei 121 °C autoklavieren. Die Bestandteile der antibiotischen Lösung in der angegebenen Mischung lösen.	
Zu dem auf unter 47 °C abgekühlten Grundmedium werden steril zuerst das sterile lysierte Pferdeblut und dann die antibiotische Lösung gegeben und gemischt.	
Aufbewahrung: im Dunkeln bei 5 °C bzw. laut Herstellerangaben	
Verwendbarkeit: 7 Tage bzw. laut Herstellerangaben; Oxoid: 14 Tage	

6. Preston-Selektiv Anreicherungsbouillon

z.B. Nutrient Broth No.2; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom (CM0067) ergänzt mit Champylobacter Growth Supplement; Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, United Kingdom (SR0232)	
Zusammensetzung	g/l
Tierisches Gewebe, enzymatisch verdaut	10,0
Pepton	10,0
Natriumchlorid	5,0
destilliertes Wasser	945
pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C	
Die Grundbestandteile bzw. Das vollständige Trockengrundmedium, bei Bedarf unter Erwärmen, im destillierten Wasser lösen. Anschließend den pH-Wert prüfen und gegebenenfalls einstellen. 15 min bei 121 °C autoklavieren	
steriles lysiertes Pferdeblut: z.B. Laked Horse Blood; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom (SR0048C)	50 ml
antibiotische Lösung: z. B. Modified Preston Campylobacter Selective Supplement; Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom (SR0204)	
Zusammensetzung je Röhrchen (1 Röhrchen je 500 ml):	
Polymyxin B-Sulfat	2,500 I. E. 5000-I. E.
Rifampicin	5 mg 0,01 g
Trimethoprimlactat-Salz	5 mg 0,01 g
Amphotericin B	5 mg 0,01 g
Ethanol, 95% (Volumenanteil)	5 ml
Die Bestandteile der antibiotischen Lösung im 95%igen Ethanol lösen. Zu dem auf unter 47 °C abgekühlten Grundmedium werden steril zuerst das sterile lysierte Pferdeblut und dann die antibiotische Lösung gegeben und gemischt. 12,5 g Nährbouillon Nr. 2 in 475 ml Aqua dest. lösen und 15 Minuten bei 121 °C autoklavieren. Auf 50 °C oder tiefer abkühlen (pH 7,4 ± 0,2 bei 25 °C). Zur abgekühlten Bouillon (unter 47 °C) aseptisch 25 ml lysiertes Pferdeblut (OXOID, Art.-Nr. SR0048C) sowie den gelösten Inhalt je eines Röhrchens Campylobacter-Selektiv-Supplement (Preston) (Art.-Nr. SR0117E oder SR0204E) und Campylobacter-Anreicherungs-Supplement (Art.-Nr. SR0232) geben und gut mischen. Je 5 ml auf sterile Röhrchen mit Schraubverschluss verteilen. Es ist wichtig, die Luftsäule über dem Flüssignährboden so niedrig wie möglich zu halten, um mikroaerophile Bedingungen zu gewährleisten. Aufbewahrung: im Dunkeln bei 5 °C bzw. laut Herstellerangaben Verwendbarkeit: 7 Tage bzw. laut Herstellerangaben; Oxoid: 7 Tage	

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de