

Amtliche Methodensammlung

Vibrionenseuche der Rinder (Campylobacter fetus ssp. venerealis)

- 1. Charakterisierung der Infektion
- 2. Untersuchungsmaterial
- 3. Untersuchungsgang

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Die bovine genitale Campylobacteriose ist eine durch Infertilität, frühe embryonale Mortalität und Abort charakterisierte venerische Erkrankung. Sie wird durch *C. fetus* ssp. *venerealis*, ein Bakterium mit ausgeprägtem Tropismus für den Genitaltrakt des Rindes, verursacht (enzootischer Abort). Der Präputialsack klinisch gesunder Bullen ist das natürliche Erregerreservoir.

C. fetus ssp. *fetus* hat seinen natürlichen Standort im Intestinaltrakt des Rindes, doch kann dieser Keim sporadische Aborte verursachen (sporadischer Abort).

Die Erregerübertragung erfolgt hauptsächlich durch den natürlichen Deckakt. Da klinisch gesunde Bullen die Erreger im Samen enthalten können, besteht die Gefahr der Verbreitung dieser Krankheit auch durch künstliche Besamung.

1.2 Klinische Symptomatik

Bullen zeigen meist keine klinischen Erscheinungen. Bei weiblichen Tieren sind geringe entzündliche Veränderungen im Scheiden- und Gebärmutterbereich zu beobachten. Hauptsymptome sind Fruchtbarkeitsstörungen, Aborte in jedem Trächtigkeitsstadium und Sterilität.

Nach der ersten Infektion im Bestand verläuft die Seuche akut mit plötzlichem Rückgang der Aufnahme-rate (z. T. unter 10 %). Im Verlauf der Zeit tritt die Seuche ins chronische Stadium ein, die älteren Tiere erlangen nach und nach ihre ursprüngliche Fruchtbarkeit wieder.

1.3 Differentialdiagnose

Bei Aborten kommen Brucellose, Trichomoniasis und Salmonellose in Betracht.

1.4 Diagnostische Indikation

- Fruchtbarkeitsstörungen
- siehe Rechtsgrundlage 1.6.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtungen

- Staatliche Untersuchungsämter, Tiergesundheitsdienste
- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor (NRL) für Vibrionenseuche der Rinder (bovine genitale Campylobacteriose), Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Tel. 03641-804-2262

1.6 Rechtsgrundlage

Verordnung zum Schutz gegen übertragbare Geschlechtskrankheiten der Rinder vom 3. Juni 1975 (BGBI. I S.1307) in der jeweils gültigen Fassung

2. Untersuchungsmaterial

Es ist möglichst frisches, nicht älter als 6 Stunden altes Untersuchungsmaterial zu verwenden. Die Proben sind kühl und dunkel zu verpacken, die Verwendung von Transport- und/oder Anreicherungsmedien (TAM) (siehe 3.1.) wird empfohlen. Der Versand sollte in isolierten Containern (Temperaturbereich 4 bis 30 °C) und lichtgeschützt erfolgen. Die Anwendung von TAM ist wesentlich, wenn die Proben nicht innerhalb des o. g. Zeitraumes in einem Labor bearbeitet werden können.

Bei männlichen Tieren werden für den Campylobacter-Nachweis Präputialspül- und/oder Spermaproben entnommen. Bei weiblichen Tieren erfolgt die Anzüchtung aus Genitalsekreten, die durch Ansaugen, Lavage oder mittels Tampons gewonnen werden. Bei Aborten sind die Plazenta sowie der Mageninhalt, die Lunge und die Leber das geeignete Untersuchungsmaterial.

3. Untersuchungsgang

Falls der Zeitraum zwischen Entnahme und bakteriologischer Untersuchung nicht mehr als 6 Stunden beträgt, können die Proben direkt angelegt werden.

3.1 Transport- und/oder Anreicherungsmedien

Für den Probenversand stehen mittlerweile handelsübliche Systeme auf der Basis verschiedener Transportmedien zur Verfügung, wobei für Campylobacter spp. besonders Cary-Blair-Medium (z. B. Copan) empfohlen wird. Speziell für den Transport von C. fetus-Subspezies eignen sich auch das Lander- sowie das modifizierte SBL-Medium.

Als gut geeignet zum Transport von Kulturen erwiesen sich Tupfer, die in Amies-Transportmedium verschickt werden können (z. B. von Sarstedt). Die Bakterien sind mehrere Tage lebensfähig und können auf geeigneten Medien wieder angezogen werden.

Lander-Medium (Anhang 1)

Es basiert auf einer Mueller-Hinton-Bouillon.

Nach der Inokulation des Untersuchungsmaterials ist bei 37 °C über 3 Tage mikroaerob zu inkubieren und auf Blutagarplatten sowie Selektivmedien auszustreichen.

Modifiziertes SBL-Medium (Anhang 2)

Die mit dem Untersuchungsmaterial getränkten Probentupfer werden in das Medium versenkt und in einem isolierten Container (Temperaturbereich 18 bis 30 °C) versandt.

Die Proben sollten innerhalb von 24 bis 48 Stunden bearbeitet werden.

3.2 Isolierung

Blutagar-Basen

Für die *Campylobacter*-Diagnostik sind verschiedene Blutagar-Basen im Einsatz, von denen zum kulturellen Nachweis von *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus* vor allem das Skirrow-Medium (Blutagar-Basis Nr. 2, Oxoid) und der Mueller-Hinton-Agar (Merck, Art. Nr. 5437) mit einem Zusatz von 7 bis 10 Volumenprozent Schafblut empfohlen werden.

Selektivmedien

Durch den Zusatz sterilfiltrierter Hemmstofflösungen zu den Blutagar-Basen kann die selektive Isolierung von *C. fetus*-Subspezies erleichtert werden. Es werden hierfür vor allem zwei Hemmstofflösungen empfohlen:

- Hemmstofflösung Nr. 1 (Anhang 3.1.) für modifiziertes Skirrow-Medium
- Hemmstofflösung Nr. 2 (Anhang 3.2.) für Selektivagar nach Clark

Anlegen des Untersuchungsmaterials

- Jede Probe ist auf ein oder zwei Platten Blutagar-Basis und Selektivmedien anzulegen. Zu empfehlen ist auch die vorherige Filtration des Untersuchungsmaterials durch 0,65 µm Membranfilter, um einen Teil unerwünschter mikrobieller Kontaminanten zurückzuhalten.
- Zum Anlegen von Spülproben hat sich die vorherige Zentrifugation der Proben zur Campylobacter-Anreicherung nach folgendem Schema als hilfreich erwiesen:
 - Die Proben werden 10 min bei 1200 x g zentrifugiert, der Überstand auf 2 Röhrchen verteilt und 30 min bei 5000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wird mit einer sterilen Pipette ca. 1 cm über dem Boden Material entnommen, auf Nährbodenplatten aufgetropft (ersten Tropfen verwerfen) und ausgestrichen.
- Die Agarplatten sind bei 37 °C mikroaerob in einem Gasgemisch aus 85 % N₂, 10 % CO₂ und 5 % O₂ in Anaerobengefäßen, 5 (bis 7) Tage zu inkubieren. Die Einstellung des Gasgemisches kann mit der Gasaustauschtechnik oder mittels Gas-Entwickler-Kits erfolgen. Bei jedem Isolierungsversuch sollten zwei Kontrollstämme mitgeführt werden.

3.3 Identifizierung

Nach 3- bis 5-tägiger Inkubation bilden *C. fetus*-Subspezies Kolonien von 1 - 3 mm Durchmesser. Diese erscheinen leicht rosa, sind rund, konvex, glatt und glänzend mit gleichmäßigem Rand.

Verdächtige Kolonien können auf folgende Weise identifiziert werden:

- Oxidase-Reaktion: Von einer 1%igen Tetramethyl-p-phenylendiamindihydro-chlorid-Lösung wird ein Tropfen auf Filterpapier gegeben und mit einem Glasstab Material einer verdächtigen Kolonie darübergestrichen. Bei positiver Reaktion verfärbt sich das Koloniematerial in 5 bis 10 Sek. ultramarinblau. Campylobacter-Spezies reagieren positiv.
- Es stehen auch handelsübliche Oxidase-Teststreifen zur Verfügung, z. B. Bactident Oxidase-Test-Strips (Merck).
- <u>Nativpräparat:</u> C. fetus-Subspezies sind beweglich und zeigen im Phasenkontrastmikroskop eine typische, "schießende" Beweglichkeit, die bei Subkultivierung verloren gehen kann.
- Gramfärbung: Im Grampräparat handelt es sich um gramnegative, dünne, gebogene Stäbchen, 0,3 bis 0,4 μm breit und 0,5 bis 8,0 μm lang.
- Kurze Formen (kommaförmig), mittlere Formen (S-förmig) und lange Formen (spiralförmig mit mehreren Windungen) können gleichzeitig in einer Kultur beobachtet werden.

Nach Herstellung einer Reinkultur sind die o. g. Bestätigungsreaktionen zu wiederholen.

3.4 Differenzierung

3.4.1. Phänotypische Differenzierung

Da *C. fetus* ssp. *venerealis* ein anspruchsvoller Keim ist, können bereits geringfügige Änderungen der Medienzusammensetzung die Differenzierungsergebnisse beeinflussen. Es müssen daher Kontrollstämme beider Subspezies parallel mitgeführt werden. Die wichtigsten phänotypischen Merkmale von *Campylobacter* spp. zeigt Tabelle 1 im Anhang. Die Bezeichnung der Biovare von *C. sputorum* erfolgte nach den Empfehlungen des Subkomitees für die Taxonomie von Campylobacter (Vandamme u. On, 2001). Danach ist die frühere Biovar *bubulus* nicht mehr eigenständig, sondern wurde in die Biovar *sputorum* eingegliedert.

Katalase-Probe

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

- H₂S-Nachweis

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

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.

Kochsalz-Toleranz

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.

Glycin-Toleranz

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

Darüber hinaus können zur *Campylobacter*-Differenzierung gegebenenfalls weitere Reaktionen (s. Tabelle 3) angeschlossen werden:

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. Aufgrund der ansteigenden Quinolonresistenz bei *C. jejuni* und *coli* ist die Aussagekraft dieser Reaktion stark eingeschränkt.

Cephalothin-Resistenz

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

2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Resistenz

Eine Blutplatte mit Zusatz von 0,04 % TTC wird mit Kulturmaterial beimpft und nach 4 Tagen mikroaerober Inkubation bei 37 °C abgelesen. Bei Resistenz kommt es zum Wachstum roter, metallisch glänzender Kolonien.

Der Test kann auch mit selbst bereiteten Testblättchen (200 µg TTC) durchgeführt werden (Tränken der Testblättchen in einer TTC-Lösung, 30 mg/ml, und trocknen; Lichtschutz erforderlich).

Hippurat-Hydrolyse

Für die Durchführung dieser Reaktion sind zahlreiche Modifikationen beschrieben. Zur Bewertung der Reaktion ist es erforderlich, einen positiven 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 6 Monate haltbar). Die zu differenzierenden Isolate werden in 2 bis 3 cm Abständen 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 schmutziggraue Färbung ohne Hofbildung.

Indoxylazetat-Hydrolyse

Es wird eine 10%ige Indoxylazetatlösung in Azeton hergestellt, auf Teststreifen gegeben, Ko-Ioniematerial aufgebracht und ein Tropfen steriles Aqua dest. zugegeben. Die positive Reaktion zeigt sich nach 5 bis 10 min als tiefblaue Färbung.

<u>Temperaturtoleranz</u>

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

3.4.2. Differenzierung der Campylobacter-fetus-Subspezies mittels PCR

Es handelt sich um einen zweistufigen PCR-Assay, der eine Identifizierung und Differenzierung der C.-fetus-Subspezies ermöglicht (Müller et al., 2003). Nach der Anzüchtung auf Mueller-Hinton-Agar (Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin) wird eine Impföse Koloniematerial in 200 µl PBS suspendiert.

<u>DNA-Extraktion</u>: Im ersten Schritt wird die *Campylobacter*-DNA durch Extraktion mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits nach Angaben des Herstellers gewonnen (z. B. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Mannheim). Davon werden 5 µl in jeder PCR eingesetzt.

PCR: Zum Ausschluss einer PCR-Inhibition sind externe Amplifikationskontrollen (DNA-Extrakte der Typstämme C. fetus ssp. fetus DSMZ-5361 sowie C. fetus ssp. venerealis NCTC 010354, DSMZ-18826) mitzuführen.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermix zur Verwendung in der PCR

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
steriles Wasser	ad 45 µl	
PCR-Pufferlösung (10-fach), enthaltend	5 µI	PCR-Pufferlösung einfach, enthal-
c = 15 mmol/l MgCl ₂		tend c = 1,5 mmol/l MgCl ₂
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix	2 µI	je 200 µmol/l
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
Primer forward/reverse	je 1 µl	0,125 μmol/l
Taq-DNA-Polymerase	0,2 μΙ	1 U pro Reaktionsansatz

Die von Hum et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotide Primer sind sowohl zur Speziesidentifizierung C. fetus als auch zur Subspeziesdifferenzierung C. fetus ssp. venerealis geeignet. Die PCR-Ansätze, Annealing-Temperatur und Zyklenzahl sind für beide Primerpaare identisch. Folgendes Temperatur-Zeit-Programm wird für die 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 60 °C (Annealing) 60 Sek. bei 72 °C (Elongation)

2 Min. bei 72 °C. abschließende Elongation:

Der Nachweis von C. fetus ssp. venerealis kann auch mit den Primerpaaren CVEN-L/CVEN-R2 oder Cf C05fw/Cf C05r durchgeführt werden, wobei andere Annealing-Temperaturen zu beachten sind (Tabelle 2).

Analyse der Amplifikate: Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt in 1,5%igen (für MG3F/MG4R) bzw. 2%igen (für VenSF/VenSR) Agarosegelen nach Elektrophorese bei 200 V mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Detektion. Die Fragmentgrößen sind entsprechend Tabelle 2 zuzuordnen.

Auswertung: Die DNA-Extrakte der Typstämme C. fetus ssp. fetus DSMZ 5361 sowie C. fetus ssp. venerealis DSMZ 18826 bzw. NCTC 010354 dienen als Referenzmaterialien. Mit dem Primerpaar MG3F/MG4R wird für beide *C. fetus*-Subspezies ein Amplifikat von 764 bp erhalten. Damit ist die Spezies *C. fetus* identifiziert. Die Subspeziesdifferenzierung und der Nachweis von C. fetus ssp. venerealis erfolgt mit den Primerpaaren VenSF/VenSR (142 bp), CVEN-L/CVEN-R2 (233 bp) oder Cf C05fw/Cf C05r (54 bp). Auf diese Weise ist eine eindeutige Differenzierung der beiden C. fetus-Subspezies gegeben.

Tabelle 2: PCR-Primer zur Identifizierung und Differenzierung der C.-fetus-Subspezies

Target	Primer	Primersequenz	Annealing-	Am-	Spezifität	Literatur		
		(5´-3´)	Temperatur	plikon-				
				größe				
cstA	MG3F	GGT AGC CGC AGC	60 °C		Spezies	Hum et al.,		
		TGC TAA GAT			C. fetus	1997		
	MG4R	TAG CTA CAA TAA CGA		764 bp*				
		CAA CT						
par A	VenSF	CTT AGC AGT TTG CGA	60 °C		Subspezies	Hum et al.,		
		TAT TGC CAT T			venerealis	1997		
	VenSR	GCT TTT GAG ATA ACA		142 bp				
		ATA AGA GCT T						
ISC <i>fe</i> 1	CVEN-L	ATT AGT ATT TGC AAT	50 °C		Subspezies	Abril et al.,		
		ATG TGA A			venerealis	2007		
	CVEN-R2	AAT TGA TAT TAA ATT		233 bp				
		TGA TTG A						
hypothe-	Cf	ATG ATA AGA TAT ATT	48 °C		Subspezies	van Bergen		
tical	C05fw	TGT ATC AG			venerealis	et al., 2005		
protein	Cf C05r	GAT GAA GAA TAT TAC		54 bp				
		AAG ATA AT						

^{*} Fragmentgröße nach eigenen Untersuchungen

3.5 Methoden der Validierung

Die Spezifität aller Primerpaare wurde gegenüber *C. sputorum* ssp. *bubulus*, *C. sputorum* biova*r sputorum*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. hyointestinalis* ssp. *hyointestinalis* und *Arcobacter butzleri* getestet. Die Sensitivität konnte bis auf 60 fg/µl DNA, das entspricht 30 cfu/µl, reproduzierbar ermittelt werden. Die PCR-Assays ermöglichen die spezifische Identifizierung der Spezies *C. fetus* sowie die Differenzierung der Subspezies *venerealis* von Subspezies f*etus*. Der PCR-Assay mit den Primern MG3F/MG4R und VenSF/VenSR nach Hum *et al.* wurde bei 150 Isolaten zur Differenzierung eingesetzt. Die beiden anderen PCR-Primerpaare CVEN-L/CVEN-R2 nach April *et al.* und Cf C05fw/Cf C05r nach van Bergen *et al.* sind bisher an über 36 100 Isolaten überprüft worden.

3.6 Weitere Methoden zum Nachweis von C. fetus ssp. venerealis

Der Erregernachweis ist auch serologisch mittels Vaginalschleim-Agglutinationstest (VAT) oder als Direktnachweis mit fluoreszierenden Antikörpern (FAT) möglich, aber die Aussagekraft beider Methoden ist eingeschränkt (Lander, 1990). Der VAT ergibt häufig falsch-negative, gelegentlich aber auch falsch-positive

Ergebnisse. Der FAT ist nicht ausreichend sensitiv und erlaubt darüber hinaus keine Differenzierung zwischen C. fetus ssp. venerealis und C. fetus ssp. fetus. Folglich bildet der Erregernachweis mit anschließender Differenzierung mittels PCR das zuverlässigste Verfahren.

Literatur

Abril, C., E.M. Vilei, I. Brodard, A. Burnens, J. Frey and R. Miserez. (2007): Discovery of insertion element ISCfe 1: a new tool for Campylobacter fetus subspecies differentiation. Clin. Microbiol. Inf., 13, 993-1000.

ANONYMOUS (2008): Bovine genital Campylobacteriosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, sixth Edition, pp. 652-661.

Goossens, H., Butzler, J.-P., Takeda, Y. (1985): Demonstration of cholera-like enterotoxin production by C. jejuni. FEMS Microbiol. Lett. 29, 73-76.

Hum, S., McInnes, A. (1993): Bovine Campylobacteriosis. In: "Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases" (Hrsg. Corner, L.A., Bagust, T.J.): Standing Committee on Agriculture and Resource Management, East Melbourne.

Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., On, S.L.W. (1997): Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of Campylobacter fetus subspecies. Aust. Vet. J. 75, 827-831.

Lander, K.P. (1990): The development of a transport and enrichment medium for Campylobacter fetus. Br. vet. J. 146, 327-333.

Müller, W., Hotzel, H., Schulze, F. (2003): Identifizierung und Differenzierung der Campylobacter-fetus-Subspezies mittels PCR. Dtsch. tierärztl. Wschr. 110, 55-59.

Nachamkin, I. (1999): Campylobacter and Arcobacter. In: Manual of Clinical Microbiology. 7th Edition, Eds.: Muray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Yolken, R. H. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 716-726.

On, S. L.W., Atabay, H.I., Corry, J.E.L., Harrington, C.S., Vandamme, P. (1998): Emended description of Campylobacter sputorum and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including C. sputorum biovar paraureolyticus, a urease-producing variant from cattle and humans. Int. J. System. Bacteriol. 48, 195-206.

Schulze, F., Bagon, A., Müller, W., Hotzel, H. (2006): Identification of Campylobacter fetus subspecies by phenotypic differentiation and PCR. J. Clin. Microbiol. 44, 2019-2024.

Ursing, J.B., Lior, H., Owen, R.J. (1994): Proposal of minimal standards for describing new species of the familiy Campylobacteraceae. Int. J. System. Bacteriol. 44, 842-845.

van Bergen, M.A.P., Dingle, K.E, Maiden, M.C, et al. (2005): Clonal nature of Campylobacter fetus as defined by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 43, 5888-5898.

Vandamme, P., De Ley, J. (1991): Proposal for a new family, Campylobacteraceae. Int. J. System. Bacteriol. 41, 451-455.

Vandamme, P., On, S. L. W. (2001): Recommendations of the subcommittee on the taxonomy of Campylobacter and related bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 719-721.

van der Graaf-van Bloois, L., van Bergen, M.A.P., van der Wal, F.J., de Boer, A.G., Duim, B., Schmidt, T., Wagenaar, J.A. (2013): Evaluation of molecular assays for identification Campylobacter fetus species and subspecies and development of a C. fetus specific real-time PCR assay. J. Microbiol. Methods, 95, 93-97.

Anhang

1. Lander-Medium

Mueller-Hinton-Bouillon mit 5 g bakteriologischer Kohle	1000 ml					
Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 15 min werden aseptisch zugefügt:						
"Campylobacter Wachstumssupplement" (Oxoid).	2 Flaschen					
Lysiertes Pferdeblut	70 ml					
Vancomycin	40 mg					
Polymyxin-B-sulfat	10000 IU					
Cycloheximid	100 mg					
Trimethoprim	20 mg					
5-Fluorouracil	500 mg					
Das Medium wird zu 10-ml-Portionen abgefüllt. Dabei ist auf die gleichmäßige Verteilung der bakteriologischen Kohle zu achten. Es kann für 3 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.						

2. Modifiziertes SBL-Medium

	1					
Agar	8,0 g					
Na-glycerophosphat	10,0 g					
1%ige wässrige CaCl₂-Lösung	10 ml					
Cysteinhydrochlorid	250 mg					
0,1%ige wässrige Methylenblaulösung	2 ml					
Aqua dest.	1000 ml					
Nach dem Autoklavieren werden pro Liter hinzugefügt:						
Polymyxin-B-sulfat	1000 IU					
Novobiocin	5 mg					
Bazitracin	15000 Einheiten					
Cycloheximid	20 mg					
Das Medium ist unter sterilen Bedingungen in Röhrchen zu verteilen, die vollständig zu füllen sind.						

3. Hemmstofflösungen

(Mengenangaben/ml Blutagarbasis, nach Empfehlungen von Hum u. McInnes, 1993)

3.1. Hemmstofflösung Nr. 1 für modifiziertes Skirrow-Medium

Vancomycin	20 µg					
Trimethoprim	10 µg					
Polymyxin-B-sulfat	5 IU					
Cycloheximid	100 µg					
Die ersten 3 Bestandteile können als handelsübliches Supplement bezogen werden, z. B. Oxoid SR 69 (Skirrow).						

3.2. Hemmstofflösung Nr. 2 für Selektivagar nach Clark

Bacitracin	15 IU
Novobiocin	5 µg
Polymyxin-B-sulfat	1 IU
Cycloheximid	10 µg

Tabelle 3: Kulturelle und biochemische Merkmale von *Campylobacter* spp. (Nachamkin, 1999; Vandamme und De Ley, 1991; Ursing *et al.*, 1994; On *et al.*, 1998)

Spezies	Katalase	Reduk			ر بـ ا	Hydrolyse		Toleranz gegen		Resistenz gegen		Wachs- tum		H ₂
		Katalase	Nitrat	Nitrit	H ₂ S (TSI)	Na-Selenit- Reduktion	Hippurat	Indoxyl-aze- tat	Kochsalz 3,5 %	Glycin 1 %	Nalidixin- säure	Cepha- Iothin	25 °C	42 °C
C. jejuni														
ssp. <i>jejuni</i>	+	+			+	+	+		+	S	R		+	
ssp. <i>doylei</i>	V	-	-	-		V	+	-	+	S	S	-	-	-
C. coli	+	+	-	-	+	-	+	-	+	S	R	-	+	-
C. Iari	+	+	-	-		-	-	-	+	R	R	-	+	-
C. upsalien- sis	-/±	+	-	-		-	+	-	V	S	S	-	+	-
C. helveti- cus	-	+		-	-	-	+			S	S	-	+	-
C. fetus ssp. fetus	+	+	-	-	+	-	-	-	+	R	S	+	-	-
ssp. venere- alis	+	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	+	-	-
C. sputorum biovar sputorum	-	+	+	+	+	-	-	V	+	R/S	S	±	+	-
biovar fe- calis	+	+	+	+	+	-	-	V	+	R	S	±	+	-
biovar pa- raureolyti- cus ¹⁾	-	+/V		+/V		-	-		+	R	R/V			
C. hyointes- tinalis	+	+	1	+		1	1	-	+	R	S	+	+	V
C. concisus	ı	+	+	+		-	1	-	+	R	R	-		+
C. mucosa- lis	-	+	+	+		-	-	-	+	R	S	-	+	+
C. curvus	-	+	+	+		-	+	-	+	S		-	+	+
C. rectus	-	+	+	+		_	+	-	+	S		-	±	+
C. showae	+	+		+		-	+	-	V	R	S	-	+	+

= variabel, unterschiedliche Reaktion

= schwache Reaktion

= Triple-Sugar-Iron-Agar

1) Urease-positiv

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.bund.de