

## Amtliche Methode und Falldefinition

# Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* *ssp. venerealis*)

## Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode .....	3
1. Charakterisierung der Infektion .....	3
1.1 Erreger .....	3
1.2 Klinische Symptomatik .....	3
1.3 Differentialdiagnose .....	3
1.4 Diagnostische Indikation .....	3
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtungen .....	3
1.6 Rechtsgrundlage (in der jeweils geltenden Fassung) .....	4
2. Untersuchungsmaterial.....	5
2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis.....	5
2.2 Beförderung der Proben.....	5
3. Untersuchungsgang .....	5
3.1 Transport- und/oder Anreicherungsmedien .....	6
3.2 Isolierung.....	6
3.3 Identifizierung .....	7
3.4 Differenzierung .....	8
3.5 Methoden der Validierung .....	12
3.6 Weitere Methoden zum Nachweis von <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> .....	13
Literatur.....	14
Anhang.....	15
Falldefinition - Vibrionenseuche der Rinder; <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> .....	18

## Amtliche Methode

### 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 in das chronische Stadium ein, die älteren Tiere erlangen nach und nach ihre ursprüngliche Fruchtbarkeit wieder. **Reinfektionen sind möglich.**

#### 1.3 Differentialdiagnose

Bei Aborten kommen Brucellose, Trichomoniasis, Salmonellose und **Neosporose** in Betracht.

#### 1.4 Diagnostische Indikation

- Fruchtbarkeitsstörungen
- siehe Rechtsgrundlage 1.6.

#### 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtungen

- Staatliche Untersuchungsämter, Tiergesundheitsdienste

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

- Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor (NRL) für Vibrionenseuche der Rinder (bovine genitale Campylobacteriose), Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Tel. 03641-804-2249 (Ansprechpartner: Dr. H. El-Adawy)

### 1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- EU-Verordnung 2016/429 EU-Tiergesundheitsrechtsakt/Animal Health Law (AHL) in der jeweils gültigen Fassung zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“).
- EU-Durchführungsverordnung 2018/1882 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen.
- EU-Durchführungsverordnung 2021/403 in der jeweils geltenden Fassung [...] hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen, der Muster für amtliche Bescheinigungen und der Muster für Veterinär-/amtliche Bescheinigungen für den Eingang in die EU von Sendungen bestimmter Kategorien von Landtieren und ihres Zuchtmaterials und für deren Verbringungen zwischen Mitgliedstaaten [...].
- EU-Durchführungsverordnung 2021/404 in der jeweils geltenden Fassung zur Festlegung der Listen von Drittländern, Gebieten und Zonen derselben, aus denen der Eingang in die EU von Tieren, Zuchtmaterial und Erzeugnissen tierischen Ursprungs [...] zulässig ist [...].
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“).
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 (Zuchtmaterialbetriebe - innerhalb der EU) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] die Zulassung von Zuchtmaterialbetrieben betreffend sowie die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit und die Tiergesundheit in Bezug auf Verbringungen innerhalb der Union von Zuchtmaterial von bestimmten gehaltenen Landtieren [...].
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 (Verbringen von Landtieren) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der EU.
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 (Import EU) in der jeweils gültigen Fassung zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] hinsichtlich Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten Tieren, bestimmtem Zuchtmaterial und bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs in die EU und für deren anschließende Verbringung und Handhabung.
- Delegierte Verordnung (EU) 2019/2035 (Zulassung Betriebe) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429, [...] hinsichtlich Vorschriften für Betriebe, in denen Landtiere gehalten werden, und für Brüttereien sowie zur Rückverfolgbarkeit von bestimmten gehaltenen Landtieren und von Bruteiern
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) in der jeweils geltenden Fassung.
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung.

## 2. Untersuchungsmaterial

### 2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis

Es ist möglichst frisches Untersuchungsmaterial, nicht älter als 6 Stunden, 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 essentiell, wenn die Proben nicht innerhalb des o.g. Zeitraumes in einem Labor bearbeitet werden können.

Bei männlichen Tieren werden für die *Campylobacter*-Anzucht Präputialspül- und/oder Spermaproben entnommen. Bei weiblichen Tieren erfolgt die Anzucht 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.

#### Einsendungen an das Labor:

Bitte verwenden Sie das Einsendeformular, das auf der Internetseite des Labors zu finden ist:

<https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-vibrionenseuche-der-rinder/>

Proben bzw. Isolate sind nach Möglichkeit per Kurier zum FLI zu schicken. Die entsprechenden Vorschriften sind zu beachten (siehe Kapitel „Probenversand - Diagnostische Proben der amtlichen Methodensammlung“). Die Proben sind in jedem Fall telefonisch anzukündigen (03641 804-2249 oder -2342 oder -2264 (Labor)).

### 2.2 Beförderung der Proben

Aufgrund der Empfindlichkeit von *Campylobacter* gegenüber Sauerstoff sollten für den Transport spezielle Transport-Medien verwendet werden (z. B. „Amies Agar Gel mit Kohle-Transport-Tupfer“).

Den entsprechenden Teil des Präanalytikhandbuches finden Sie hier: <https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IBIZ/ALA-Vibrionenseuche-20150306.pdf>

Bitte füllen Sie einen Einsendebogen für die Vibrionenseuche der Rinder (bovine genitale Campylobacteriose) aus, wenn Sie Proben an das FLI bzw. NRL senden: <https://fms.fli.de/lip/form/display.do?%24context=99ABBEB6C688D5CB4863>

## 3. Untersuchungsgang

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

# Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

## 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 für den Transport von Kulturen haben sich Tupfer erwiesen, die in Amies-Transportmedium verschickt werden. Die Bakterien sind dann mehrere Tage lebensfähig und können auf geeigneten Medien wieder angezogen werden.

### Lander-Medium (Anhang 1)

Das Medium basiert auf einer Mueller-Hinton-Bouillon.

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

### Modifiziertes SBL-Medium (Anhang 2)

Die mit dem Untersuchungsmaterial getränkten Proben tupfer 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-Basis-Medien

Für die *Campylobacter*-Diagnostik sind verschiedene Blutagar-Medien 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 Rinderblut empfohlen werden.

### Selektivmedien

Durch den Zusatz sterilfiltrierter Hemmstofflösungen zu den Blutagar-Basis-Medien 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-Medien und Selektivmedien anzulegen. Zu empfehlen ist auch die vorherige Filtration des Untersuchungsmaterials durch 0,65 µm Membranfilter, um einen Teil unerwünschter mikrobieller Kontaminanten zurückzuhalten.

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

- 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 30min bei 5000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wird mit einer sterilen Pipette ca. 1cm 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 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> in Anaerobengefäßen, 5 (bis 7)-72 h bis 5 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 bis 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).
- Nativpräparat: *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 Kontrollstämmen beider Subspezies parallel mitgeführt werden (Tab. 1).

**Tabelle 1: *Campylobacter*-Typ und -Referenzstämmen**

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

Die wichtigsten phänotypischen Merkmale von *Campylobacter* spp. zeigt Tabelle 3 im Anhang. Die Bezeichnung der Biovare von *C. sputorum* erfolgte nach den Empfehlungen des Subkomitees für die Taxonomie von *Campylobacter* (Vandamme und 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.
- H<sub>2</sub>S-Nachweis  
Als Medium dient Triple-Sugar-Iron (TSI)- Agar. Der Agar wird mit 48 Stunden altem Kulturmateriale beimpft und 2 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet. Die positive Reaktion führt zu einer Schwärzung des Agars.



## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

- 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 bzw. Trübung kontrolliert.
- Glycin-Toleranz  
Thioglykolat-Bouillon oder Blutagar, jeweils mit einem Gehalt von 1 % Glycin, wird mit Kulturmaterial beimpft, 3 bis 4 Tage bei 37 °C mikroaerob bebrütet und auf Wachstum bzw. Trübung kontrolliert.

Darüber hinaus können zur *Campylobacter*-Differenzierung ggf. weitere Reaktionen (s. Tabelle 3) abgeschlossen 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 Blutagarplatte 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).

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

- 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 Abständen von 2 bis 3 cm knöpfchenförmig auf die Paperoberfläche 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, Koloniematerial aufgebracht und ein Tropfen steriles Aqua Dest. zugegeben. Die positive Reaktion zeigt sich nach 5 bis 10min als tiefblaue Färbung.
- Temperaturleranz  
Die Prüfung kann auf Blutagarplatten 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 ermöglichen kann (Müller *et al.*, 2003). Nach der Anzucht auf Mueller-Hinton-Agar (Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin) wird eine Impföse Koloniematerial in 200 µl PBS suspendiert.

**DNA-Extraktion:** Im ersten Schritt wird die *Campylobacter*-DNA durch Extraktion mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits nach Angaben des Herstellers gewonnen. Davon werden 5 µl in jeder PCR eingesetzt.

**PCR:** Pro 50 µl-Ansatz werden die folgenden Lösungen als Mastermix (Tabelle 2) in der beschriebenen Reihenfolge eingesetzt. Die Mengen gelten für den Einsatz von 1 µl Template einer DNA-Extrakt-Konzentration

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

von ca. 100 ng/µl. (Bei geringerer DNA-Ausbeute der Extraktion können 2 bis 5 µl eingesetzt werden; entsprechend weniger Wasser ist zu verwenden.)

Zu den Ansätzen für die Positivkontrollen (*C. fetus* ssp. *fetus* DSMZ 5361 und *C. fetus* ssp. *venerealis* NCTC 010354, DSMZ-18826) wird jeweils 1 µl der *Campylobacter* Referenz-DNA als Template einsetzen. In den Ansatz der Negativkontrolle wird 1 µl Wasser gegeben.

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

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Mastermix zur Verwendung in der PCR

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
steriles Wasser	ad 45- 49 µl	
PCR-Pufferlösung (10-fach), enthaltend c = 15 mmol/l MgCl <sub>2</sub>	5 µl	PCR-Pufferlösung einfach, enthaltend c = 1,5 mmol/l MgCl <sub>2</sub>
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2 µl	je 200 µmol/l
Primer forward/reverse	je 1 µl	0,125 µmol/l
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl	1 U pro Reaktionsansatz

Die von Hum *et al.* (1997) beschriebenen 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)  
abschließende Elongation: 2 Min. bei 72 °C.

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 3).

**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 200V mittels Ethidiumbromidfärbung und UV-Detektion. Die Fragmentgrößen sind entsprechend Tabelle 2 zuzuordnen.

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

**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 764bp 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. Die geringe Sensitivität von 85% und Spezifität von 83 % (Hum *et al.*, 1997) schränkt die Aussagekraft dieser Differenzierung jedoch erheblich ein, sodass die Phänotypisierung weiterhin die Referenztechnik bleibt. Die Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS) kann für die Subtypisierung von *Campylobacter fetus* verwendet werden, um die Einschränkungen der derzeitigen PCR- und MLST-Protokolle zu überwinden (Abdel-Glil *et al.*, 2020).

**Tabelle 3:** PCR-Primer zur Identifizierung und Differenzierung der *C.-fetus*-Subspezies

Target	Primer	Primersequenz (5´-3´)	Annealing-Temperatur	Amplikongröße	Spezifität	Literatur
cstA	MG3F	GGT AGC CGC AGC TGC TAA GAT	60 °C	764 bp*	Spezies	Hum <i>et al.</i> , 1997
	MG4R	TAG CTA CAA TAA CGA CAA CT			<i>C. fetus</i>	
par A	VenSF	CTT AGC AGT TTG CGA TAT TGC CAT T	60 °C	142 bp	Subspezies	
	VenSR	GCT TTT GAG ATA ACA ATA AGA GCT T			<i>venerealis</i>	
ISCfe1	CVEN-L	ATT AGT ATT TGC AAT ATG TGA A	50 °C	233 bp	Subspezies	Abril <i>et al.</i> , 2007
	CVEN-R2	AAT TGA TAT TAA ATT TGA TTG A			<i>venerealis</i>	
Hypothetical protein	Cf C05fw	ATG ATA AGA TAT ATT TGT ATC AG	48 °C	54 bp	Subspezies	van Bergen <i>et al.</i> , 2005
	Cf C05r	GAT GAA GAA TAT TAC AAG ATA AT			<i>venerealis</i>	

\* Fragmentgröße nach eigenen Untersuchungen

### 3.5 Methoden der Validierung

Die Spezifität aller Primerpaare wurde gegenüber *C. sputorum* ssp. *bubulus*, *C. sputorum* biovar *sputorum*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. hyointestinalis* ssp. *hyointestinalis* und *Arcobacter butzleri* getestet (Tabelle 1). Die analytische Sensitivität konnte bis auf 60fg/µl DNA, das entspricht 30cfu/µl, reproduzierbar ermittelt werden. Die PCR-Assays ermöglichen eine Identifizierung der Spezies *C. fetus* sowie die Differenzierung der Subspezies *venerealis* von Subspezies *fetus*. Das 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 Abril *et al.* und Cf C05fw/Cf C05r nach van Bergen *et al.* sind an über 100 Isolaten überprüft worden.

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

Der Erregernachweis ist auch serologisch mittels Vaginalschleim-capture ELISA oder als Direktnachweis mit fluoreszierenden Antikörpern (IFAT) möglich, aber die Aussagekraft beider Methoden ist eingeschränkt (Lander, 1990).

Die Sequenzierung des gesamten Genoms kann für die Subtypisierung von *Campylobacter fetus* verwendet werden um die Einschränkungen der derzeitigen PCR- und MLST-Protokolle zu überwinden (Abdel-Glil *et al.*, 2020). Die *in silico* PCR-Assays für die Subtypisierung von *Campylobacter fetus* wurden durchgeführt (Abdel-Glil *et al.*, 2020) und zeigten eine hohe Empfindlichkeit von Primerpaaren, die *C. fetus* auf Speziesebene nachweisen, wobei die von McGoldrick *et al.* (2013) entwickelten Primer 100% sensitiv waren. Der von McGoldrick *et al.* (2013) beschriebene ISCfe1-spezifische Primer war zu 100% sensitiv. Entsprechend den Ergebnissen von Abdel-Glil *et al.*, 2020 wurde zur Auswertung von Gesamtgenomsequenzen eine bioinformatische Toolbox ([https://gitlab.com/FLI\\_Bioinfo/cfvcatch/-/issues/1](https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/cfvcatch/-/issues/1)) durch das NRL zur Verfügung gestellt.

Gesamtgenomsequenzierung mit anschließender bioinformatischer Datenanalyse ist in vielen Ländern bereits Standard bei der Isolat-basierten Feintypisierung, für Ausbruchsanalysen und zur phänotypischen Charakterisierung von *Campylobacter fetus*. 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 mindestens 80 % der Basen einer Probe einen Qualitätswert (Phred Score) 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  $\sim 1.8 \text{ Mbp} \pm 25 \%$  und einen N50-Wert von 15 kB aufweisen. Zur Typisierung ist das klassische MLST (7 Gene), basierend auf der Genomsequenz, möglich. Hochauflösende Phylogenie ist durch die Bestimmung von Einzelnukleotidänderungen (SNPs) möglich.

### Literatur

- Abdel-Glil MY, Hotzel H, Tomaso H, Linde J (2020) Phylogenomic analysis of *Campylobacter fetus* reveals a clonal structure of insertion element *ISCfe1* positive genomes. *Front Microbiol* 11, 585374. doi: 10.3389/fmicb.2020.585374
- Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R (2007) Discovery of insertion element *ISCfe 1*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation. *Clin Microbiol Inf* 13, 993-1000.
- Goossens H, Butzler JP, 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 LA, Bagust TJ): Standing Committee on Agriculture and Resource Management, East Melbourne.
- Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW (1997) Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 75, 827-831.
- Lander KP (1990) The development of a transport and enrichment medium for *Campylobacter fetus*. *Br Vet J* 146, 327-333.
- McGoldrick A, Chanter J, Gale S, Parr J, Toszeghy M, Line K (2013) Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. *J Microbiol Methods* 94, 199-204. doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.014
- 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. 7<sup>th</sup> Edition, Eds.: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Am Soc Microbiol*, Washington, D.C. p. 716-726.
- OIE (2021) Bovine genital Campylobacteriosis. In: OIE Terrestrial Manual 2021, Chapter 3.4.4., pp. 1-12. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.04.04\\_BGC.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf)
- On SLW, Atabay HI, Corry JEL, Harrington CS, 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 JB, Lior H, Owen RJ (1994) Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*. *Int J System Bacteriol* 44, 842-845.
- van Bergen MAP, Dingle KE, Maiden MC *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 SLW (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 MAP, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA (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 5g bakteriologischer Kohle	1000 ml
Nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 15min werden aseptisch zugefügt:	
" <i>Campylobacter</i> Wachstumssupplement" (z.B. Oxoid*).	2 Flaschen entsprechend der Herstellerangaben zu verwenden*
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.	
* Oxoid™ <i>Campylobacter</i> -Wachstums-Supplement ist ein flüssiges Supplement für das verbesserte Wachstum und die Erhöhung der Aerotoleranz von <i>Campylobacter</i> -Arten. Jedes Fläschchen ist ausreichend für 500 ml Medium: Stand zum 23.05.2022	

### 2. Modifiziertes SBL-Medium

Agar	8,0 g
Na-Glycerophosphat	10,0 g
1%ige wässrige CaCl <sub>2</sub> -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.	

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

### 3. Hemmstofflösungen

(Mengenangaben/ml Blutagarbasis, nach Empfehlungen von Hum, 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



## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

**Tabelle 3:** 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 <sub>2</sub> S (TSI)	Na-Selenit-Reduktion	Hydrolyse		Toleranz gegen		Resistenz gegen		Wachstum		H <sub>2</sub> erforderlichlich
		Nitrat	Nitrit			Hippurat	Indoxyl-azetat	Kochsalz 3,5%	Glycin 1%	Nalidixinsäure	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> <sup>1)</sup>	-	+/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  
1) Urease-positiv

## Falldefinition - Vibrionenseuche der Rinder; *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*

### Klinisches Bild

Die Vibrionenseuche der Rinder wird heute als bovine genitale Campylobacteriose bezeichnet. Bullen zeigen meist keine 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 Aufnahmerate (zum Teil unter 10 %) und damit verlängerten Abkalbe Intervallen (zwischen Kaltzeiten). Im Verlauf der Zeit tritt die Seuche in das chronische Stadium ein, die älteren Tiere erlangen nach und nach ihre ursprüngliche Fruchtbarkeit wieder. Reinfektionen sind möglich.

### Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Erregerisolierung (kultureller Nachweis aus Abortmaterial, Präputialspülproben oder Sperma)
- Genomnachweis: PCR, Abgrenzung zwischen *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus*

Indirekter Nachweis:

- Vaginalschleim-Agglutinationstest, Immunfluoreszenztest (Aussagekraft beider Methoden ist eingeschränkt)

### Differenzialdiagnose

Bei Aborten: Brucellose, Trichomoniasis, Salmonellose und Neosporose

### Epidemiologischer Zusammenhang

*C. fetus* ssp. *venerealis* ist ausschließlich an den Genitaltrakt des Rindes adaptiert. Hauptübertragungsweg ist der natürliche Deckakt. Da klinisch gesunde Bullen den Erreger im Samen enthalten können, besteht die Gefahr der Erregerübertragung durch künstliche Besamung.

### Voraussetzung für den Verdacht

(§2, Abs. 2, Nr. 2 und 3 der VO)

Ein oder mehrere Rinder verkalben oder rindern mehrmals um.

Vorliegen klinischer Symptome im Scheiden- und Gebärmutterbereich.

Vorliegen klinischer Symptome mit epidemiologischem Zusammenhang zu einem labordiagnostisch bestätigten Fall.

### Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:

(§2, Abs. 2, Nr. 1 der VO)

Vorliegen klinischer Symptome bei weiblichen Rindern, die durch den kulturellen Erregernachweis **in Proben aus den Eihäuten**, der abgestoßenen Frucht, des Vaginalschleims oder des Gebärmutterausflusses bestätigt werden.

Bei Bullen kultureller Erregernachweis **in Proben** von Präputialspülflüssigkeit oder Spülproben der Innenwand der künstlichen Scheide oder des Samens.

### Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG) in der jeweils geltenden Fassung.
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung.
- EU-Verordnung 2016/429 EU-Tiergesundheitsrechtsakt/Animal Health Law (AHL) in der jeweils gültigen Fassung zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“).
- EU-Durchführungsverordnung 2018/1882 über die Anwendung bestimmter Bestimmungen zur Seuchenprävention und -bekämpfung auf Kategorien gelisteter Seuchen und zur Erstellung einer Liste von Arten und Artengruppen, die ein erhebliches Risiko für die Ausbreitung dieser gelisteten Seuchen darstellen.
- EU-Durchführungsverordnung 2021/403 in der jeweils geltenden Fassung [...] hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen, der Muster für amtliche Bescheinigungen und der Muster für Veterinär-/amtliche Bescheinigungen für den Eingang in die EU von Sendungen bestimmter Kategorien von Landtieren und ihres Zuchtmaterials und für deren Verbringungen zwischen Mitgliedstaaten [...].
- EU-Durchführungsverordnung 2021/404 in der jeweils geltenden Fassung zur Festlegung der Listen von Drittländern, Gebieten und Zonen derselben, aus denen der Eingang in die EU von Tieren, Zuchtmaterial und Erzeugnissen tierischen Ursprungs [...] zulässig ist [...].
- Delegierte Verordnung (EU) 2018/1629 zur Änderung der Liste der Seuchen in Anhang II der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“).
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/686 (Zuchtmaterialbetriebe - innerhalb EU) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] betreffend die Zulassung von Zuchtmaterialbetrieben sowie die Anforderungen an die Rückverfolgbarkeit und die Tiergesundheit in Bezug auf Verbringungen innerhalb der EU von Zuchtmaterial von bestimmten gehaltenen Landtieren [...].
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/688 (Verbringen von Landtieren) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] hinsichtlich Tiergesundheitsanforderungen an Verbringungen von Landtieren und Bruteiern innerhalb der EU.
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 (Import EU) in der jeweils gültigen Fassung zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 [...] hinsichtlich Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten

## Vibrionenseuche der Rinder (*Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*)

Tieren, bestimmtem Zuchtmaterial und bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs in die EU und für deren anschließende Verbringung und Handhabung.

- Delegierte Verordnung (EU) 2019/2035 (Zulassung Betriebe) zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429, [...] hinsichtlich Vorschriften für Betriebe, in denen Landtiere gehalten werden, und für Brütereien sowie zur Rückverfolgbarkeit von bestimmten gehaltenen Landtieren und von Bruteiern.