

## Campylobacter- und Helicobacter-Diagnostik

Campylobacter wurden erstmals 1909 von McFadyean und Stockman<sup>1</sup> als Erreger von Erkrankungen bei Mutterschafen nachgewiesen und 1913 von denselben Autoren<sup>2</sup> aus abortierten Rinder- und Schaffoeten isoliert. Sie ordneten diese Bakterien aufgrund ihrer gekrümmten Form und schnellen Beweglichkeit den Vibrionen zu. Smith und Taylor<sup>3</sup> nannten 1919 die von ihnen ebenfalls bei abortierten Rinderfoeten festgestellten Keime *Vibrio fetus*. Die Isolierung mikroaerophiler Vibrionen bei Kälbern mit Diarrhöe gelang 1927 Smith und Orcutt<sup>4</sup> sowie 1931 Jones<sup>5</sup>, der die isolierten Bakterien als *Vibrio jejuni* bezeichnete. Doyle<sup>6</sup> beschrieb 1944 *Vibrio coli* als Erreger einer Schweinedysenterie. 1947 gelang Vincent et al.<sup>7</sup> der Nachweis von *V. fetus* beim Menschen und 1957 King<sup>8</sup> bei schwangeren Frauen.

Bei der Differenzierung verschiedener von King<sup>8</sup> isolierter Stämme wurde *Vibrio fetus* mit biochemischen Methoden und aufgrund unterschiedlicher Temperaturtoleranz von anderen Erregern unterschieden. Thermophile Erreger gingen als "related vibrio" in die Literatur ein.

Da die Keime sich von den klassischen Vibrionen unterschieden, wurde 1963 von Sebald und Véron<sup>9</sup> eine neue Gattung Campylobacter (gr. kampylos, gekrümmt) definiert und der Familie der *Spirillaceae* zugeordnet. Véron und Chatelain<sup>10</sup> beschrieben 1973 ein Klassifizierungssystem für Campylobacter, das in seinen Grundzügen bis heute gültig ist. Die Gattung Helicobacter wurde von der Gattung Campylobacter abgetrennt und umfaßt zwei Spezies. Nach Penner<sup>11</sup> kann die Gattung Campylobacter in zwei Gruppen unterteilt werden: 'Echte Campylobacter' mit den Untergruppen 'Thermophile enteropathogene Spezies' und 'Andere echte Campylobacter' sowie die Gruppe der psychrophilen Spezies.

***C. jejuni* ssp. *jejuni*** und ***C. coli*** zählen mit zu den häufigsten Enteritiserregern. *C. jejuni* ssp. *jejuni* ist hauptsäch-

lich in Geflügel (besonders Huhn) und Rindern, *C. coli* in Hausschweinen nachweisbar. Beide Spezies verursachen beim Menschen Enterocolitis mit wäßrig-schleimiger, z.T. blutiger Diarrhöe. Häufige Ursachen sind Verzehr von ungenügend erhitztem Geflügel und anderem Fleisch, roher bzw. zu wenig erhitzter Milch sowie die Übertragung von Mensch zu Mensch<sup>12</sup>.

***C. jejuni* ssp. *doylei*** wurde bisher nur aus Biopsiematerial von Erwachsenen und aus Faeces durchfallkranker Kinder nachgewiesen. Im Gegensatz zu *C. jejuni* ssp. *jejuni* wächst er nicht bei 42°C, reduziert Nitrat nicht und ist Cephalotin-sensitiv.

***C. laridis*** (früher: NARTC = Nalidixic acid resistant thermophilic Campylobacter) ist ein bei Möwen nachgewiesener Darmkeim mit möglicher Bedeutung als Enteritiserreger beim Menschen. Die klinischen und epidemiologischen Besonderheiten sind jedoch noch zu wenig bekannt. In bakteriologischer Hinsicht ist er leicht mit *C. jejuni* ssp. *jejuni* zu verwechseln.

***C. fetus* ssp. *fetus*** (früher: *C. jejuni* ssp. *intestinalis*) verursacht Aborte bei Schafen und Rindern und kann bei abwehrgeschwächten Patienten vor allem Septikämie sowie Meningitis bei Neugeborenen hervorrufen.

***C. fetus* ssp. *venerealis*** führt bei Rindern zu Aborten; eine Humanpathogenität ist nicht gesichert.

***C. sputorum*** und ***C. concisus*** wurden als Kommensalen der Mundhöhle gefunden.

***C. upsaliensis*** wurde vereinzelt als Durchfallerreger bei Kindern gefunden.

### Gattung Campylobacter

- I. Echte Campylobacter
  - A. Thermophile enteropathogene Spezies
    - C. jejuni* ssp. *jejuni*
    - ssp. *doylei*
    - C. coli*
    - C. laridis* Urease-negative Varianten
    - Urease-positive Varianten
    - „*C. upsaliensis*“
  - B. Andere echte Campylobacter
    - C. fetus* ssp. *fetus*
    - ssp. *veneralis*
    - C. hyointestinalis*
    - C. sputorum* Biovar sputorum
    - Biovar bubulus
    - Biovar faecalis
    - C. mucosalis*
    - C. concisus*
- II. Psychrophile Spezies
  - C. nitrofigilis*
  - C. cryaerophila*

### Gattung Helicobacter

- H. pylori* (*C. pylori*)
- H. mustelae* (*C. mustelae*)
- C. cinaedi*
- C. fennelliae*

### Differentialdiagnostische Merkmale von Campylobacter und Helicobacter (nach Penner<sup>11</sup> und Kist<sup>23</sup>).

Keim	Wachstum bei			Oxidase	Katalase	Nitrat	Hippurat	H <sub>2</sub> S	Urease	Antibiotika-Sensibilität		
	25°	37°	42 °C							Nal	Cep	Pen
<b>C. jejuni</b>												
ssp. jejuni	-	+	+	+	+	+	+	-	-	S	R	R
ssp. doylei	-	+	-	+	d	-	+	-	-	S	S	R
C. coli	-	+	+	+	+	+	-	-	-	S	R	R
C. laridis	-	+	+	+	+	+	-	+	-	R	R	R
"C. upsaliensis"	-	+	+	+	d	+	-	-	-	S	S	-
<b>C. fetus</b>												
ssp. fetus	+	+	d	+	+	+	-	+	-	R	S	R
ssp. venerealis	+	+	-	+	+	+	-	-	-	R	S	S
C. hyointestinalis	d	+	+	+	+	+	-	+	-	R	S	-
<b>C. sputorum</b>												
Biovar sputorum	-	+	+	+	-	+	-	+	-	R	S	-
Biovar bubulus	d	+	d	+	-	+	-	+	-	R	S	-
Biovar faecalis	d	+	+	+	+	+	-	+	-	R	S	R
C. mucosalis	+	+	+	+	-	+	-	+	-	d	S	-
C. concisus	-	+	+	+	-	+	-	+	-	R	-	-
C. cryaerophila	+	+	-	+	+	+	-	-	-	R	-	-
C. cinaedi	-	+	-	+	+	+	-	-	-	S	d	-
C. fennelliae	-	+	-	+	+	-	-	-	-	S	S	-
H. pylori	-	+	-	+	+	-	-	-	+	R	S	S
H. mustelae	-	+	+	+	+	+	-	-	+	S	R	-

+: mehr als 90% positiv; -: mehr als 90% negativ; d: 10-90% positiv; S: sensitiv; R: resistent  
 Nal: Nalidixinsäure-Blättchen (30 µg); Cep: Cephalotin-Blättchen (30 µg); Pen: Penicillin-Blättchen (10 IE)

### Zusammensetzung der OXOID Supplemente zur Isolierung von Campylobacter.

Bestandteile je l Nährboden	Anreicherungs- Supplement	Selektiv-Supplement							
		Butzler	Blaser-Wang	Preston	Skirrow	CAT	CCDA	Karmali	Bolton
	(SR 84)	(SR 85)	(SR 98)	(SR 117)	(SR 69)	(SR 174)	(SR 155)	(SR 167)	(SR 183)
Amphotericin B	-	-	2 mg	-	-	10 mg	10 mg	-	-
Bacitracin	-	25 000 IE	-	-	-	-	-	-	-
Cephalothin	-	-	15 mg	-	-	-	-	-	-
Cephazolin	-	15 mg	-	-	-	-	-	-	-
Cefoperazon	-	-	-	-	-	23 mg	32 mg	32 mg	20 mg
Colistin	-	10 000 IE	-	-	-	-	-	-	-
Cycloheximid	-	50 mg	-	100 mg	-	-	-	100 mg	50 mg
Novobiocin	-	5 mg	-	-	-	-	-	-	-
Polymyxin B	-	-	2 500 IE	5 000 IE	2 500 mg	-	-	-	-
Rifampicin	-	-	-	10 mg	-	-	-	-	-
Trimethoprim	-	-	5 mg	10 mg	5 mg	-	-	-	20 mg
Vancomycin	-	-	10 mg	-	10 mg	-	-	20 mg	20 mg
Hämin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Natriumpyruvat	250 mg	-	-	-	-	-	-	100 mg	-
Natriumdisulfid	250 mg	-	-	-	-	-	-	-	-
Eisen(II)-sulfat	250 mg	-	-	-	-	4 mg	-	-	-
Teicoplanin	-	-	-	-	-	4 mg	-	-	-

## Nährböden

### Zusammensetzung der Ersatzsupplemente: Alternative Rezeptur mit Amphotericin B

Bestandteile je l Nährboden	Karmali, mod. (SR 205)	Preston, mod. (SR 204)	Bolton, mod. (SR 208)
Bacitracin	-	-	-
Amphotericin B	10 mg	10 mg	5 mg
Colistinsulfat	-	-	-
Natriumcephazolin	-	-	-
Novobiocin	-	-	-
Natriumpyruvat	100 mg	-	-
Cefoperazon	32 mg	-	10 mg
Vancomycin	20 mg	-	10 mg
Polymyxin B	-	5000 IE	-
Rifampicin	-	10 mg	-
Trimethoprim	-	10 mg	10 mg

### Wiederauffindung von 70 *Campylobacter jejuni*-Stämmen auf sieben Selektivnährböden, (nach Gun-Monroe<sup>13</sup>).

Nährboden	Koloniezahl <sup>a</sup>	P-Wert <sup>b</sup>
Blutagar (Kontrolle)	7,95 ± 0,36	-
Skirrow	7,82 ± 0,48	NS
Butzler	7,77 ± 0,51	<0,05
Blaser-Wang	7,70 ± 0,56	<0,05
Preston	7,76 ± 0,52	<0,05
CCDA (ohne Amphotericin B)	7,91 ± 0,36	NS
Karmali	7,83 ± 0,37	NS

a: Log<sub>10</sub> bedeutet Koloniezahl ± Standardabweichung.

b: Signifikanz, bestimmt durch den t-Test nach Student für unpaarige Proben.

NS: nicht signifikant.

### Isolierung von *C. jejuni* aus 70 artifiziell positiven Stuhlproben, (nach Gun-Monroe<sup>13</sup>).

Nährboden	Anzahl der isolierten Stämme in % bei Bebrütung nach			
	24 Std.		48 Std.	
Blutagar (Kontrolle)	69	(99)	70	(100)
Skirrow	39	(56)	67	(96)
Butzler	38	(54)	60	(86)
Blaser-Wang	17	(24)	31	(41)
Preston	32	(46)	64	(91)
CCDA (ohne Amphotericin B)	61	(87)	69	(99)
Karmali	63	(90)	68	(97)

*H. pylori* wurde erstmals 1982 isoliert und gehört zusammen mit *H. mustelae* zur neu etablierten Gattung *Helicobacter* (siehe auch Beschreibung bei *Helicobacter-Pylori*-Selektivnährboden).

Erst die Entwicklung von Nährböden mit Antibiotika-Zusatz machte die gesamte Bedeutung von *Campylobacter* bei Erkrankungen deutlich. Das erste Selektiv-Supplement wurde von Skirrow<sup>12</sup> entwickelt; andere folgten mit weiteren Antibiotika-Kombinationen. Gun-Monro et al.<sup>13</sup> führten in Laboratorien und Kliniken eine Studie über die verschiedenen Selektivnährböden zur Isolierung ther-

mophiler *Campylobacter* durch. Die obigen Tabellen fassen ihre Ergebnisse zusammen, wobei anzumerken ist, daß der CCDA-Selektivnährboden in einer modifizierten Form (ohne Amphotericin B) eingesetzt wurde und der in dieser Arbeit eingesetzte CSM-Nährboden dem OXOID Karmali-Selektivnährboden entspricht. In den obigen Tabellen wurde der CSM entsprechend mit Karmali bezeichnet. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, daß der modifizierte CCDA- sowie der Karmali-Selektivnährboden respektive CSM allen früheren Zusammensetzungen überlegen ist. Dies bezieht sich nicht nur auf die höhere Wiederauffindungsrate, sondern auch auf die stär-

Unterdrückung der fäkalen Begleitflora bei 70 artifiziell positiven Proben, (nach Gun-Monroe<sup>13</sup>).

Nährboden	Anzahl der Platten in % mit 75% Reduktion der fäkalen Begleitflora verglichen mit der Kontrolle bei Bebrütung nach			
	24 Std.		48 Std.	
Skirrow	46	(66)	38	(54)
Butzler	56	(80)	47	(67)
Blaser-Wang	28	(40)	15	(21)
Preston	58	(83)	50	(71)
CCDA (ohne Amphotericin B)	64	(91)	59	(84)
Karmali	64	(91)	59	(84)

Bebrütung: mikroaerophil, 42°C

kere Unterdrückung der fäkalen Begleitflora bei der Isolierung von *C. jejuni*. Die generellen Schlußfolgerungen von Gun-Monro et al. wurden von Griffiths und Ribeiro<sup>14</sup> bestätigt.

**Anreicherung**

Der Wert von Anreicherungs-nährböden für Campylobacter wird kontrovers beurteilt<sup>15</sup>, bei Untersuchungen von Lebensmittel- und Umweltproben können sie aber essentiell sein<sup>16</sup>. Dabei wird eine Anreicherung bei 42°C<sup>16,17</sup> sowie bei Kälte (4°C)<sup>18</sup> beschrieben. Wenn auf diese Weise die Anreicherung gefördert wird, kann die Verwendung von Membranfiltern auf der Agaroberfläche zur Selektion von Campylobacter nützlich sein<sup>19</sup>.

**Wachstumsbedingungen im Labor**

**Atmosphäre**

Die verschiedenen Spezies der Gattung Campylobacter benötigen ein breites Spektrum an atmosphärischen Bedingungen – von strikt anaerob bis zu aerotolerant<sup>20</sup> – für ein optimales Wachstum. Die meisten Spezies liegen zwischen diesen Extremen und sind überwiegend mikroaerophil. Die OXOID CampyGen-Kits (Art.-Nr. CN 25 und CN 35) schaffen mit dem richtigen Sauerstoff- und Kohlendioxid-Anteil optimale Wachstumsbedingungen für diese mikroaerophilen Organismen.

Bei der ersten Begutachtung nach 24 Stunden ist darauf zu achten, daß sie schnell abgelesen und in die Sauerstoff-reduzierte Atmosphäre zurückgebracht werden, damit sauerstoffempfindliche Stämme nicht geschädigt werden.

**Temperatur**

Die Temperaturspanne für die Bebrütung von Campylobacter reicht von 15°C für *C. cryaerophila* bis zu 42°C für die thermophilen *C. jejuni*-, *C. coli*- und *C. laridis*-Spezies. Die meisten Stämme verfügen über eine beträchtliche Temperaturtoleranz (s. auch Tab.: Differentialdiagnostische Merkmale von Campylobacter und Helicobacter).

**Isolierung von Campylobacter aus Faeces**

Selektivnährboden direkt mittelstark unter zweimaliger Fraktionierung mit Faeces beimpfen, so daß Einzelkolonien gebildet werden können.

Platten zur Isolierung von *C. jejuni* und *C. coli* bei 42°C bebrüten. *C. fetus* wächst nicht bei 42°C; bei Verdacht auf diesen Keim bei 36°C bebrüten.

Platten 24-28 Stunden in einer mikroaerophilen Atmosphäre aus annähernd 7-10% Sauerstoff und ca. 7-10% CO<sub>2</sub> bebrüten. Dies kann am besten mit den OXOID CampyGen-Kits (Art.-Nr. CN 25 bzw. CN 35) im OXOID Anaerobiertopf (Art.-Nr. AG 25 bzw. HP 11) erfolgen.

Falls der Sauerstoffgehalt nur mit Hilfe eines "Kerzenglasses" reduziert und Kohlendioxid erzeugt werden kann, ist zur Isolierung von Campylobacter-Spezies das Campylobacter-Anreicherungs-Supplement (OXOID, Art.-Nr. SR 84) einzusetzen. Es erhöht die Sauerstofftoleranz und ermöglicht die Wiederbelebung einer größeren Anzahl Stämme.

Die DGHM<sup>21</sup> empfiehlt zur Selektion und gleichzeitig als Identifizierungsmerkmal der bei weitem häufigsten Cephalotin-resistenten *C. jejuni* und *C. coli* zwei Cephalotin-Blättchen (je 30 µg) mit auf die Platte zu legen.

Bei den auf Selektivnährböden isolierten Stämmen sind Bestätigungsnachweise durchzuführen. Einfache Schemata zur Differenzierung von Campylobacter-Spezies finden sich in der DGHM<sup>21</sup> bzw. bei Skirrow und Benjamin<sup>22</sup>. Einige biochemische Merkmale sowie das Verhalten gegenüber bestimmten Antibiotika sind der Tabelle: "Differentialdiagnostische Merkmale von Campylobacter und Helicobacter" zu entnehmen.

**Literatur**

1. McFadyean, J. und Stockman, S. (1909) HMSO London I, 156.
2. McFadyean, J. und Stockman, S. (1913) HMSO London.
3. Smith, T. und Taylor, M.S. (1919) J. Exp. Med. 30, 299.
4. Smith, T. und Orcutt, M.L. (1927) J. Exp. Med. 45, 391.
5. Jones, F.S. und Orcutt, M., Little, R.B. (1931) J. Med. Exp. 53, 853.
6. Doyle, L.P. (1944) Am. J. Vet. Res. 5, 3.
7. Vincent, R., Dumas, J. und Picard, N. (1947) C. R. Acad. Med. 131, 90.
8. King, E.O. (1957) J. Infect. Dis. 101, 119.
9. Sebald, M. und Véron, M. (1963) Ann. Inst. Pasteur (Paris) 105, 897.
10. Véron, M. und Chatelain, R. (1973) Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 122-134.
11. Penner, J.L. in: Balows, A. (Ed.) (1991) "Manual of clinical microbiology". American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Skirrow, M.B. (1977) Brit. Med. J. 9-11.

13. Gun-Munro, J. et al. (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25, 2274-2277.
14. Griffiths, A. und Ribeiro, C.D. (1988) *J. Clin. Pathol.* 41, 704-705.
15. Penner, J.L. (1988) *Clin. Microbiol. Reviews* 1, 157-172.
16. Marinescu, M. et al. (1987) *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 693-694.
17. Bolton, F.J. et al. (1983) *J. Clin. Pathol.* 36, 78-83.
18. Rubin, S.J. und Woodward, N. (1983) *J. Clin. Microbiol.* 18, 1008-1010.
19. Steele, T.W. und McDermott, S.N. (1984) *Pathology* 16, 263-265.
20. Neill, S.D. et al. (1985) *Int. J. Sys. Bacteriol.* 35 342-356.
21. DGHM (Lieferung 3, 1985) "Verfahrensrichtlinien für die Mikrobiologische Diagnostik". Kap. 1.3, S. 17-19.
22. Skirrow, M.B. und Benjamin, J. (1980) *J. Clin. Pathol.* 33, 1122.
23. Kirst, M. in : Burkhard, F. (Hrsg.) (1992) "Mikrobiologische Diagnostik". G. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 113.