

Aus der Bundesanstalt für Wassergüte, Wien-Kaisermühlen

ZUR METHODIK DES CAMPYLOBACTERNACHWEISES IN ABWASSER UND OBERFLÄCHENWASSER

G. KAVKA

Thermophile Vertreter der Bakteriengattung *Campylobacter* *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis* ((NARTC*)) sind pathogen und verursachen Enteritiden beim Menschen und bei Tieren. Sie kommen im Blut und in den Faezes, in Lebensmitteln, im Trinkwasser, in Abwässern und Oberflächengewässern vor. Sie können auch in der normalen Intestinalflora vieler Säugetiere (Rind, Schwein, Schaf, Ziege, Hund, Hase, Katze) gefunden werden. Häufig werden sie mit den Abgängen von Vögeln (z.B. Enten, Hühner) ausgeschieden (SMIBERT, 1984). In Gewässern insbesondere bei Nutzung als Badegewässer stellen sie eine potentielle Gefahr für die Gesundheit des Menschen dar. BURMAN (1984) weist auf die geringe Keimdosise, die für eine Infektion ausreicht, hin.

Der Nachweis im Wasser erfolgt qualitativ, kann aber auch semiquantitativ als Titer oder quantitativ mittels MPN-Technik durchgeführt werden. Das beschriebene Verfahren eignet sich auch für die Untersuchung von Gewässersedimenten, Aufwuchs- und Kotproben.

Herstellung der Nährmedien

Campylobacter-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Prestonbouillon)

Die Prestonbouillon dient zur selektiven Anreicherung von *Campylobacter*.

Zusammensetzung

Nährbouillon (OXOID CM 67)	12,5 g
Destilliertes Wasser	475,0 ml
Lysiertes Pferdeblut	25,0 ml
Campylobacter-Selektiv-Supplement (Preston; OXOID SR 117)	1 Fläschchen
Campylobacter-Anreicherungssupplement (OXOID SR 84)	1 Fläschchen

Nährbouillon in destilliertem Wasser lösen, 15 Minuten bei 121°C sterilisieren und auf 55 50°C abkühlen.

Dem Anreicherungssupplement 2 ml steriles destilliertes Wasser und dem Selektivsupplement 2 ml eines 50:50 Gemisches Aceton/destilliertes Wasser zufügen. Das Pferdeblut und die beiden gelösten Supplemente dem abgekühlten Medium zugeben. In Erlmeyerkolben mit 100 ml Rauminhalt zu je 20 ml aseptisch abfüllen. Die Kolben mit gelochter Aluminiumfolie verschließen.

Campyloesel-Medium (bioMerieux 43191)

Das Campyloesel-Medium ist gebrauchsfertig in Petrischalen abgefüllt und dient zur selektiven Isolierung von *Campylobacter*. Das Medium ist ein Columbia-Agar, das mit 5% Hammelblut angereichert und durch den Zusatz von vier Antibiotika für *Campylobacter* selektiv gemacht wurde.

Zusammensetzung:

Bio-Polyton	10 g
Hydrolysat tierischer und pflanzlicher Proteine	10 g
Bio-Myotone	3 g
Maisstärke	1 g
Natriumchlorid	5 g
Agar	13,5 g
Hammelblut	50 ml
Cefoperazon	15 mg
Vancomycin	10 mg
Colistin	10000 E
Amphotericin B	2 mg
Destilliertes Wasser	950 ml

Campylobacter-Selektiv-Agar, blutfrei (OXOID)

Campylobacter-Selektiv-Agar mit Cefoperazonzusatz dient zur selektiven Isolierung von *Campylobacter*.

Zusammensetzung:**Campylobacter-Selektiv-Agar-Basis, blutfrei (OXOID CM 739)**

Nährbouillon Nr. 2	25,0 g
Bakteriologische Kohle	4,0 g
Caseinhydrolysat	3,0 g
Natriumdesoxycholat	1,0 g
Eisensulfat	0,25 g
Natriumpyruvat	0,25 g
Agar	12,0

pH 7,4 ± 0,2

Cefoperazon-Selektiv-Supplement (OXOID SR 125) 1 Fläschchen

22,75 g Campylobacter-Selektiv-Agar-Basis, blutfrei, in 500 ml destilliertem Wasser lösen und 15 Minuten bei 121°C sterilisieren. Auf ca. 50°C abkühlen und aseptisch den in 2 ml sterilem, destilliertem Wasser aufgelösten Inhalt eines Fläschchens Cefoperazon-Supplement zufügen. Gut mischen und in Petrischalen eingießen.

Hippuratmedium

Zusammensetzung:

Hippursäure, Natriumsalz (Sigma H 9380) 1 g

Destilliertes Wasser, steril 100 ml

1 g Hippurat in 100 ml sterilem destilliertem Wasser lösen und in Röhrrchen zu je 0,4 ml abfüllen. Bei -20°C im Gefrierschrank vorrätig halten.

Ninhydrinreagenz (apibioMerieux 7049)

Zusammensetzung

Ninhydrin 7 g

2-Methoxyethanol 100 ml

Nalidixinsäuretestblättchen (30 µg, OXOID)

Kulturverfahren:

1. 100 ml Probenwasser durch ein Membranfilter (Porenweite 0,2 µm) filtrieren.
2. Anschließend das Membranfilter in einen Erlmeyerkolben (100 ml Rauminhalt) mit 20 ml Campylobacter-Selektiv-Anreicherungsbouillon transferieren.
3. Die Inkubation erfolgt bei 42°C 48 Stunden im mikroaerophilen Milieu (Sauerstoffgehalt ca. 5%, Kohlendioxidge-

halt ca. 10%, Stickstoffgehalt ca. 85%) im Anaerobentopf (z.B. OXOID Anaerobentopf HP011A, Campylobacter Gas Generating Kit BR056A mit Katalysator BR042A).

4. Nach der Inkubation wird mit der Impföse flüssiges Kulturmedium auf vorgetrocknetem Campyloesel-Agar (bioMerieux 43191) und Campylobacter-Selektiv-Agar, blutfrei (OXOID CM 739 + OXOID SR 125) ausgespatelt.
5. Die beiden Selektivmedien werden bei 42°C 24 Stunden im mikroaerophilen Milieu inkubiert.
6. Nach 24 Stunden Inkubationszeit werden verdächtige Kolonien mikroskopisch überprüft und gleichzeitig eine Reinkultur auf einer weiteren Blutplatte angelegt. Im negativen Fall ist die Inkubationszeit um weitere 24 Stunden zu verlängern. Verdächtige Kolonien sind 1 - 2 mm im Durchmesser, flach bis gewölbt, transparent, glatt und grau gefärbt. Fallweise tritt Schwarmbildung auf.

Im mikroskopischen Bild sind sehr schlanke, kommaförmige Einzelzellen, S-förmige Zellpaare und besonders typische, korkenzieherförmige Stäbchenketten zu erkennen. Die Zellen sind beweglich, 1,5 - 5,0 µm lang und haben einen Durchmesser von 0,2 - 0,3 µm.

7. Als Bestätigungstest sind eine Gramfärbung, ein Katalase- und Oxidasetest durchzuführen. *Campylobacter* Spezies sind gramnegativ, katalase- und oxidasepositiv.
8. Die Unterscheidung von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. laridis* (NARTC) erfolgt mittels Hippurathydrolysetest und Resistenztest gegenüber Nalidixinsäure (RICHTER, 1984). Zu diesem Zweck wird mit der Impföse Zellmaterial in 0,4 ml Natriumhippuratlösung (SIGMA H 9380) transferiert und

die Kultur 2 Stunden bei 37°C unter aeroben Bedingungen im Wasserbad inkubiert. Anschließend 0,2 ml Ninhydrinreagenz zufügen, nicht mischen und 10 Minuten bei 37°C inkubieren. Eine dunkelblaue bis violette Färbung zeigt eine Hydrolyse des Testsubstrates an. Keine bis schwachblaue Färbung indiziert eine negative Reaktion.

Die Empfindlichkeit der Spezies gegenüber Nalidixinsäure wird im Agardiffusionstest auf Blutagar mit Hilfe von Nalidixinsäuretestblättchen untersucht. Nach der Inkubation von 24 - 48 Stunden bei 37°C wird ein Hemmhof rund um das Blättchen als positive Reaktion gewertet.

Hippurathydrolyse: *C. jejuni* positiv, *C. coli* negativ, *C. laridis* negativ.

Nalidixinsäureempfindlichkeit: *C. jejuni* negativ, *C. coli* negativ, *C. laridis* positiv.

Mit dem vorgestellten Nachweisverfahren konnte *Campylobacter* z.B. aus der Donau, dem Donaukanal und aus der für Badezwecke genutzten Neuen Donau, und zwar sowohl aus dem Wasser und dem Sediment sowie aus Vogelkotproben erfolgreich isoliert werden. Im Hinblick auf die kurze Überlebenszeit von *Campylobacter* läßt der Nachweis in der warmen Jahreszeit im Wasser und der Nachweis im Sediment auf eine hohe Empfindlichkeit des Verfahrens schließen.

Danksagung

Für ihre engagierte Unterstützung bei der Optimierung des Nachweisverfahrens bin ich den Herren L. SEBELA, E. POETSCH, C. BEIWL und Frau E. MÜLLER zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

bioMerieux Handbuch (1989): *Campyloesel Medium*, S.B139.-
Österreich: Dr. Carl Reissigl, GmbH & Co. KG, Franz-Fischer-Straße 2, 6020 Innsbruck.

BURMAN, M. (1984): Zum Nachweis von *Campylobacter* im Oberflächenwasser.- Forum Städte Hygiene 35, 146-147.

OXOID Forschung.Fortschritt.Service (Informationsschrift):
Campylobacter-Selektiv-Anreicherungsbouillon
(Preston).- OXOID Deutschland GmbH, 4230 Wesel/Rh.
Postfach 1127.

Campylobacter-Selektiv-Agar, blutfrei.- OXOID Deutschland GmbH, 4230 Wesel/Rh. Postfach 1127.

RICHTER, U. (1984): Nachweis von *Campylobacter jejuni*
und *Campylobacter coli* im Routinelaboratorium.- Z ges
Hyg 30, 580-582.

SMIBERT, R.M. (1984): Genus *Campylobacter* (Eds.: KRIEG, N.R.,
HOLT J.G.)- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,
Vol.1, 111-118.

Anschrift des Verfassers: Ob.Rat Dr. Gerhard KAVKA, Bundesanstalt für
Wassergüte, Schiffmühlenstr. 120, A-1223 Wien.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [1989](#)

Autor(en)/Author(s): Kavka G.

Artikel/Article: [Zur Methodikdes Campylobacternachweises in Abwasser und Oberflächenwasser 303-309](#)