

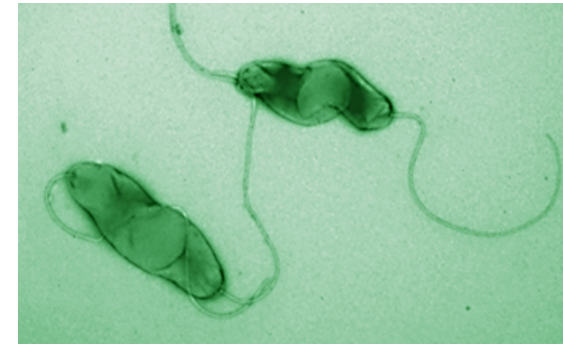
***Campylobacter* bei Geflügel im Zoonosen-Monitoring**

Kerstin Stingl, Christiane Buhler, Marie-Theres Knüver,
Maja Thieck, Bernd-Alois Tenhagen, Katja Alt



Campylobacter

- Darmbewohner (hohe Konzentration)
- bei Tieren symptomlos
- Hohe Ansprüche bei Laboranzucht, stress-sensitiv
- Wächst nicht auf/in Lebensmitteln
 - Benötigt mind. 30 °C und eine mikroaerobe Atmosphäre (10 % CO₂, 5 % O₂) zum Wachstum
- hohe genetische Variabilität (Austausch von Genen zwischen den Bakterien)
- sehr beweglich



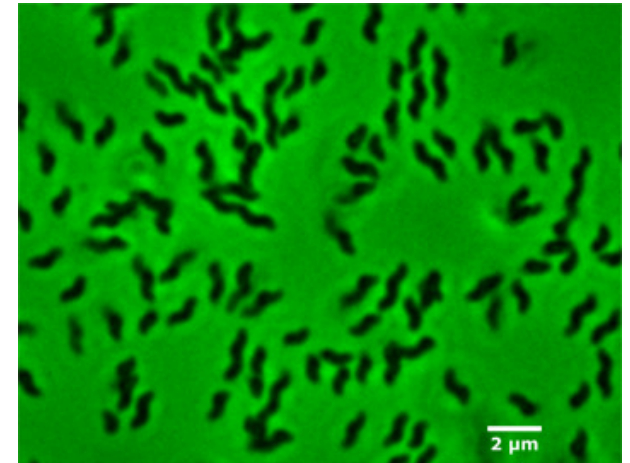
Campylobacteriose beim Menschen

- Niedrige Infektionsdosis (500-800 KbE)
- Der Mensch ist ein Zufallswirt
 - Durchfall (wässrig und blutig)
 - Fieber, Krämpfe, Erbrechen

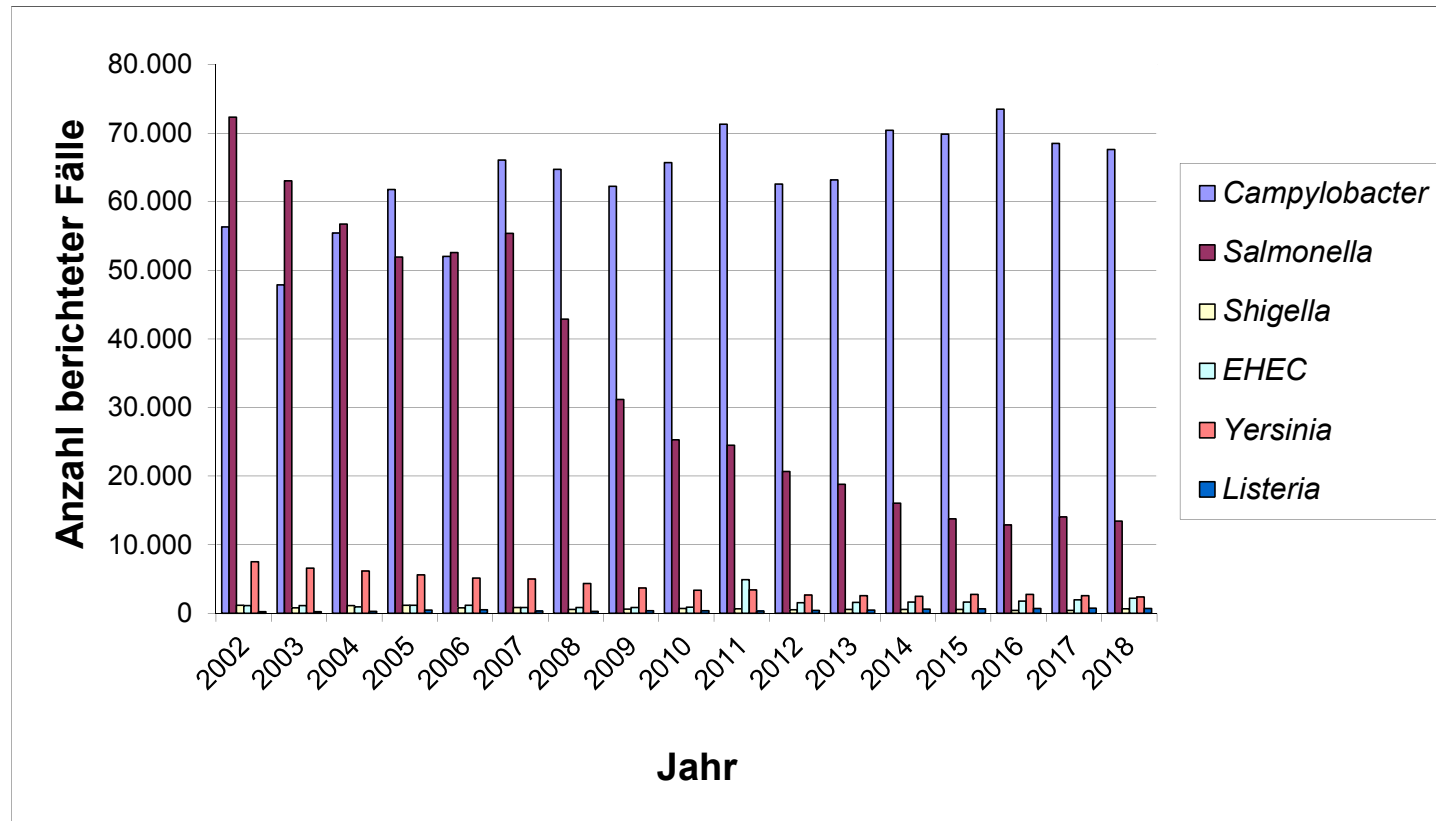
Postinfektiöse Komplikationen (~1-6 Wochen nach Akutinfektion; Keithlin et al. BMC Public Health 2014)

- Reaktive Arthritis (~ 2,9 % der Fälle)
- Reizdarmsyndrom (~ 4 % der Fälle)
- Guillain-Barré-Syndrom (~ 0,07 % der Fälle)

→ 2.4 Milliarden EUR Kosten pro Jahr in der EU für Gesundheitssystem und Produktivitätsverlust (EFSA Journal 2011; 9(4):2105)



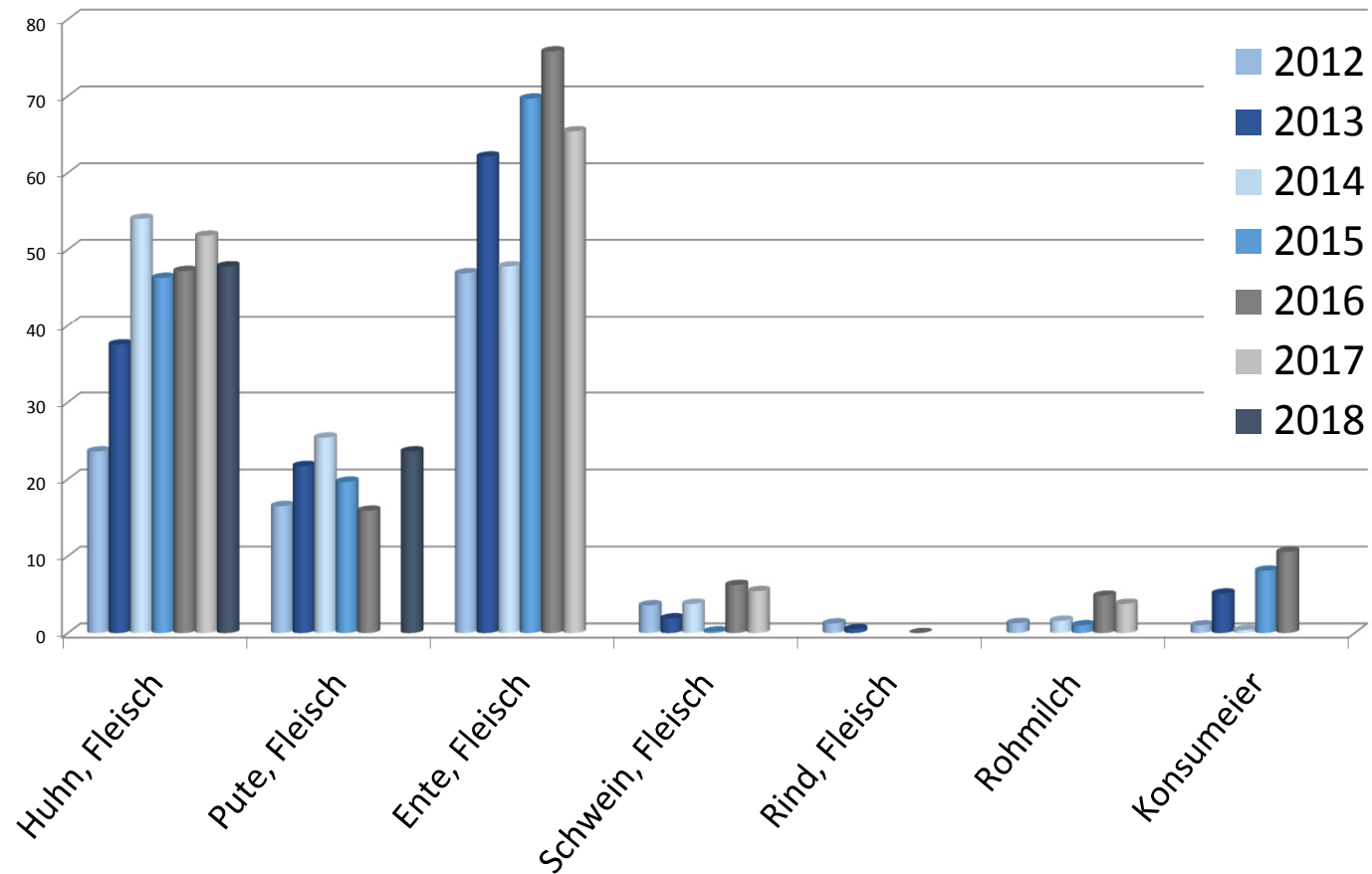
Campylobacteriose in Deutschland – aktuelle Situation



Berichtete *Campylobacter* Infektionen beim Menschen in Deutschland (Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin, 2003-2018)

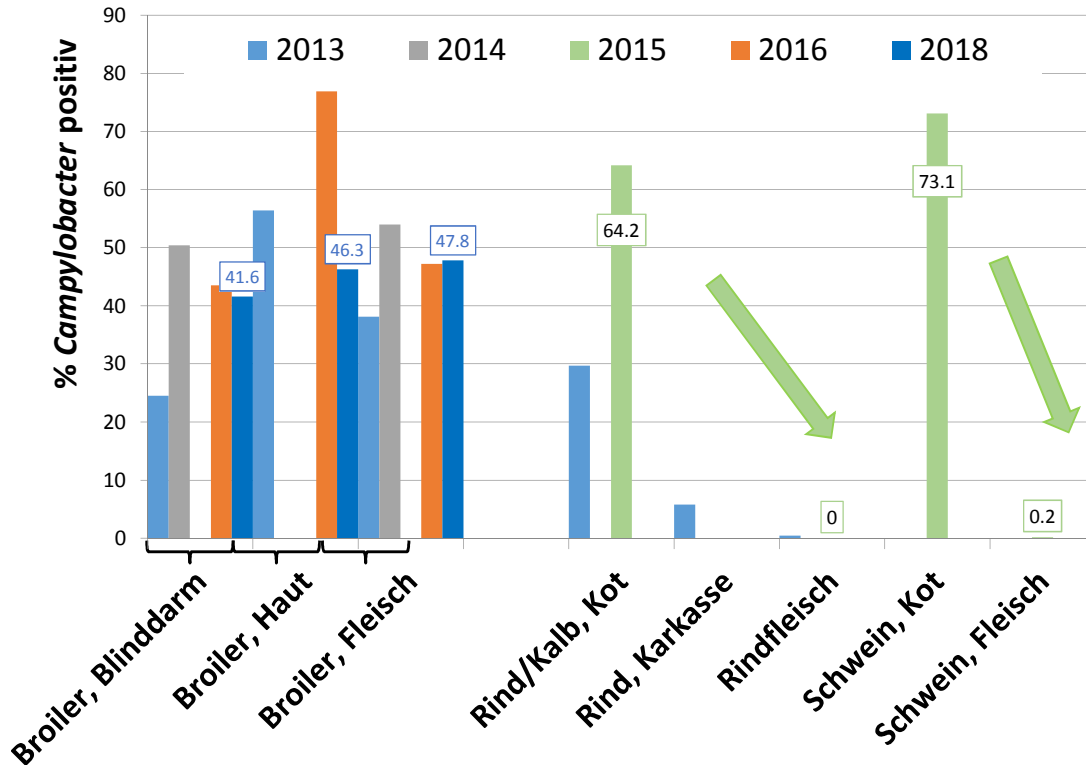
>99 % der Fälle sind klinisch und Labor-diagnostisch bestätigt

Campylobacter auf Lebensmitteln



Daten aus dem Zoonosen-Monitoring und der Überwachung aus Deutschland (Länder, BVL, BfR)

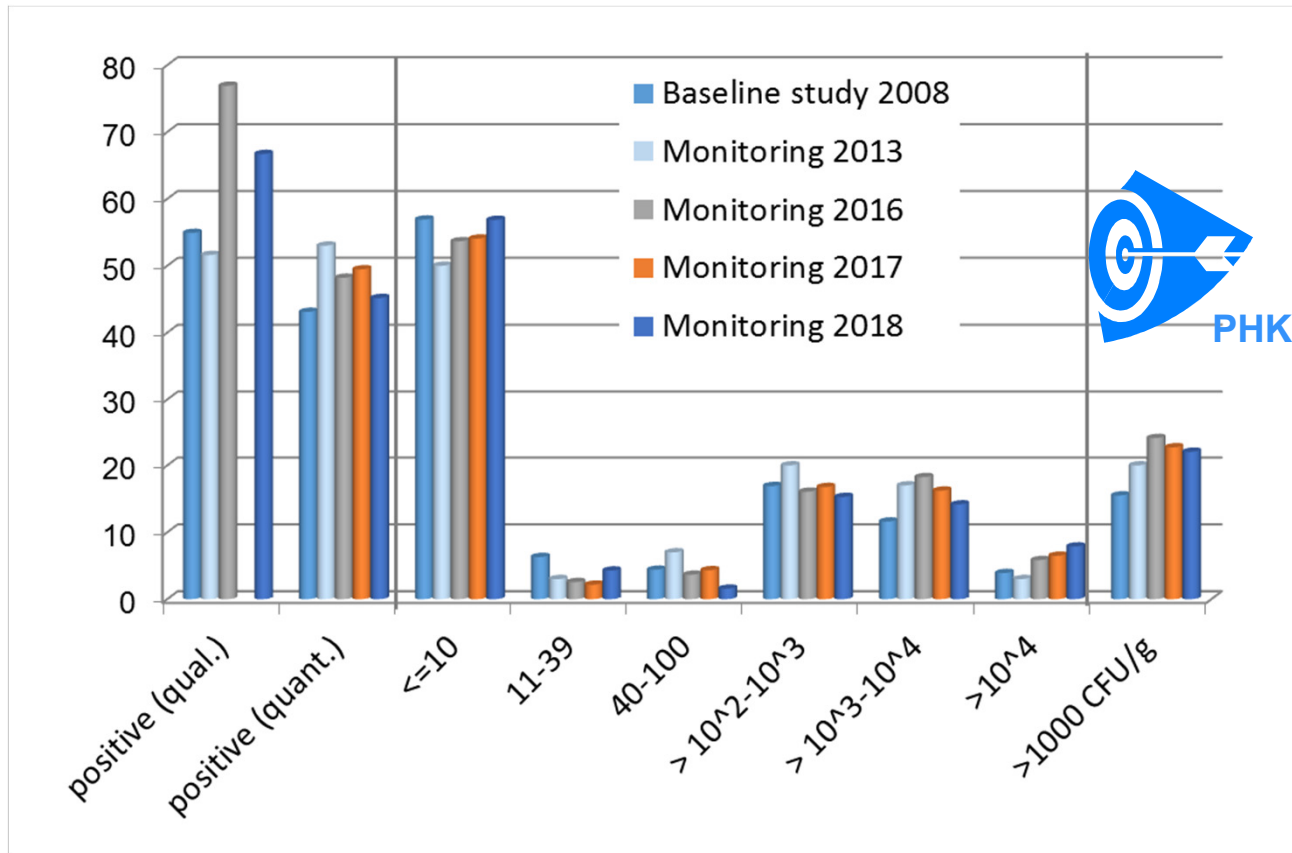
Hähnchen – wie gelangt der Keim auf das Fleisch?



Jang et al., 2007 J. Microbiol. Biotechnol.

- *Campylobacter* gelangt durch den Schlachtprozess auf das Hühnerfleisch → *Campylobacter* hält sich in tieferen Schichten der Hühnerhaut auf
- Reduktion der quant. Belastung durch Optimierung der gesamten Produktionskette
- Nicht einfach abwaschbar

Quantitative Daten zu *Campylobacter* auf Hühnerhaut (PHK)



Gilt seit 01.01.2018:
Verordnung (EG) 2017/1495

→ Bei Überschreiten des PHK muss der Produzent Maßnahmen in der Primärproduktion und/oder auf dem Schlachthof unternehmen

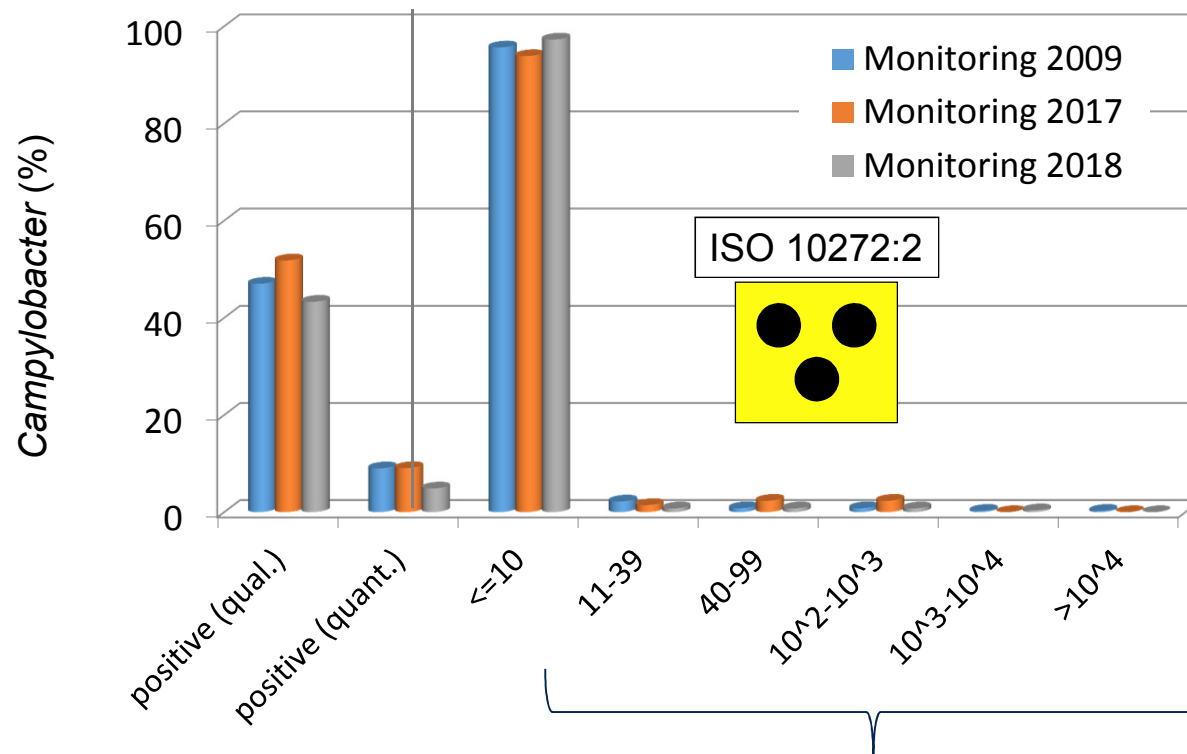
→ 2018: < 40 % über Grenzwert

2020: <30 %

2025: <20 %

- Die Einhaltung eines mikrobiologischen Kriteriums von 1000 KbE/g Hühnerhaut (**0 % über Grenzwert !**) am Schlachthof soll die Zahl der Huhn-assoziierten Humaninfektionen um 50 % reduzieren (EFSA J., 2011;9:2105)

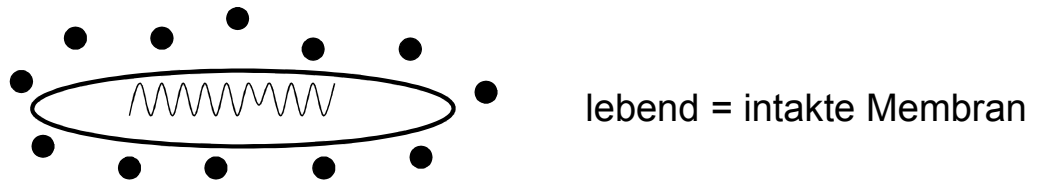
Quantitative Daten zu *Campylobacter* auf Hühnerfleisch



→ Bedarf an alternativer Quantifizierung mittels kultivierungs-unabhängigen Methoden

→ 20-30 % der Humanfälle werden durch Verzehr und/oder Zubereitung (Kreuzkontamination) von rohem Hühnerfleisch verursacht; 50-80 % auf Reservoir Huhn allgemein zurückzuführen (EFSA Journal 2011; 9(4):2105)

PCR-basierter Lebendnachweis entlang der Lebensmittelkette



DNA von toten Zellen wird durch
real-time PCR nicht detektiert

Crosslink

Nocker et al., J. Microbiol. Methods 2006
Josefsen et al., Appl. Environ. Meth. 2010
Krüger et al., PLOS One 2014
Stingl et al., BMTW 2015
Pacholewicz et al., Food Microbiol. 2019

→ Internationaler Ringversuch zur Validierung der Lebend-PCR mit ISPC (CAMPY-TRACE Projekt zusammen mit Ingrid Huber, LGL Oberschleißheim)

→ Proof-of-principle anhand von Schlachtproben bzw. von „aufweckbaren“ VBNC



Vorläufige Daten zum Ringversuch



- 12 Teilnehmer*innen (FR, NL, DE, USA, SVN, ISL, PL, UK), inkl. 2 Firmen
 - 8 Proben am 23.09.2019 verschickt (Hühnerabschwemmungen)
 - Kryoröhrchen
 - mit einer definierten Menge an lebenden *C. jejuni*
 - mit einer definierten Menge an toten *C. jejuni*
 - Lyophilisat der Internen Probenprozesskontrolle (ISPC = definierte Menge an toten *C. sputorum* Zellen)
 - Mastermixe qPCR, genomische Standards, interne Amplifikationskontrolle, mCCDA Agar (Pulver + Supplemente)
 - Letzte Teilnehmerin (USA) hat letzte Woche die Ergebnisse übermittelt
- Internes Vorabscreening der Daten (Janine Heise, Ingrid Huber)
- Einbindung der Firma Quo Data in die Daten-Auswertung
- Validierung der Daten gemäß ISO 16140-2 gegen Referenzmethode ISO 10272-2

Konzept der Validierung



In-house Validierung (LGL und BfR)

- „LOQ“: ~ 200-300 lebende *Campylobacter* (IPIU)/ml Abschwemmung
- „Trueness“: PW-Abschwemmung von Hühnerhaut, Hühnerfleisch und Hackfleisch (Rind/Schwein)
- „Accuracy“: Ergebnisse stehen noch aus
- Funktionalität der ISPC bewerten (Reduktion Restsignal toter Zellen; Korrektur von DNA-Verlusten)

Ringversuch (international)

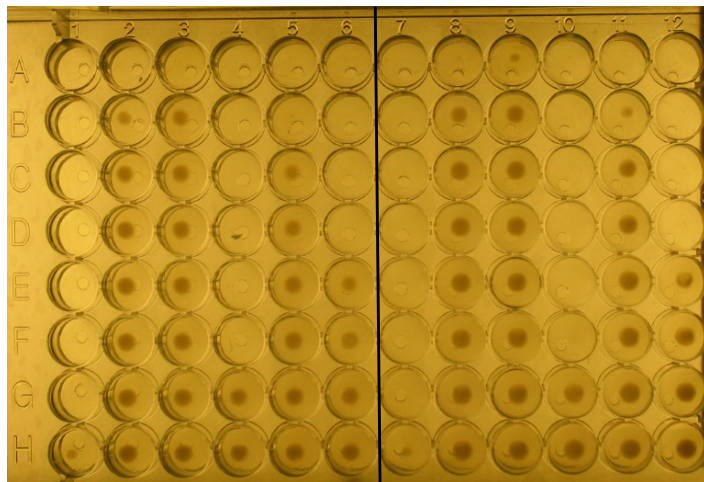
- KbE-Werte der Teilnehmer schwanken stärker als die qPCR Werte 😊
- Validierung anhand des Vergleichs des Medians der KbE-Werte aller Teilnehmer*innen mit den jeweiligen qPCR Werten
- qPCR als Triplex (thermophile *Campylobacter*, ISPC, IAC) und als 2-fach Duplex (bei hohen Kontaminationslevels an thermophilen *Campylobacter*)

„echte Schlachthofproben“

- Ziel: Prozesshygienekriterium über lebend qPCR messen (schneller, effizienter, genauer, reproduzierbarer)

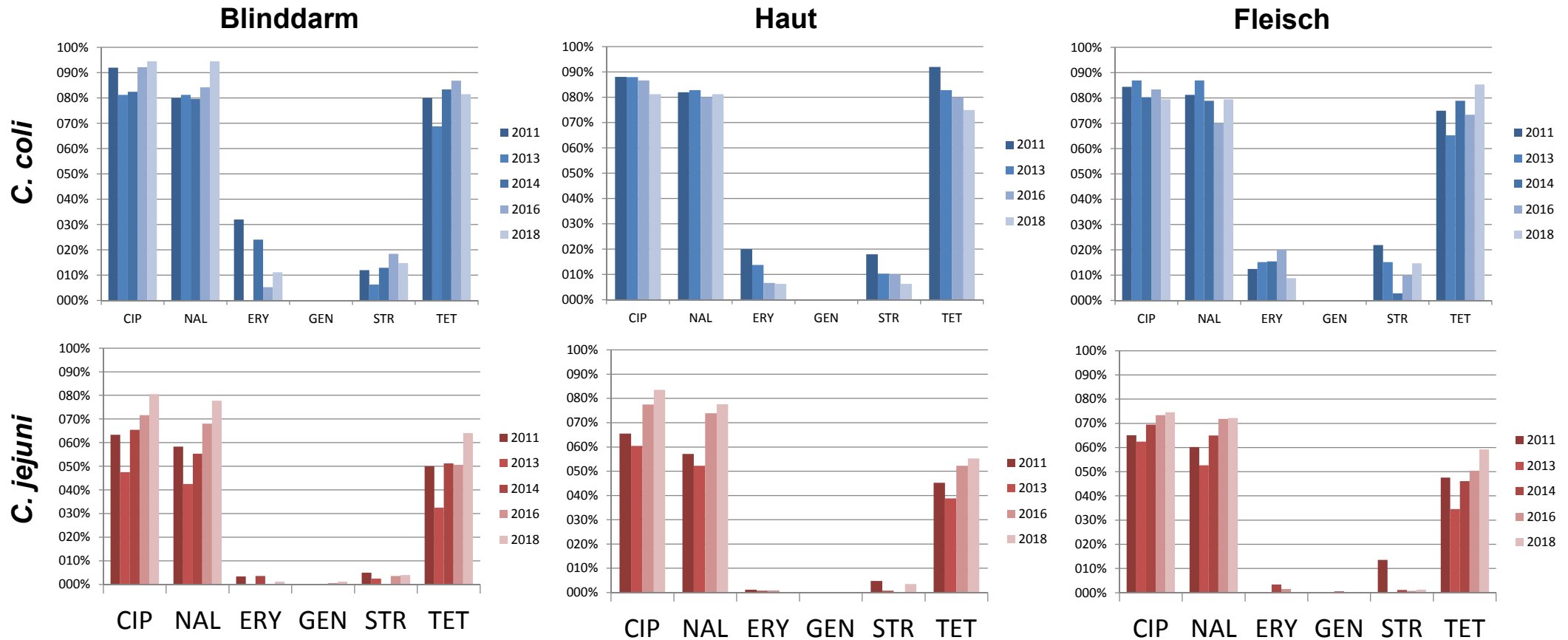
Antibiotikaresistenz in *Campylobacter*

- 30 % der Campylobacteriose-Fälle werden mit Antibiotika behandelt (Rosner et al., 2017)
- Zoonosen-Monitoring umfasst die Resistenztestung von *C. jejuni* und *C. coli* gegenüber 6 antimikrobiell wirksamen Substanzen (CIP, NAL, ERY, GEN, STR, TET)
- CLSI Standard der Mikrodilution, EUCAST epidemiologische Cut-Off Werte



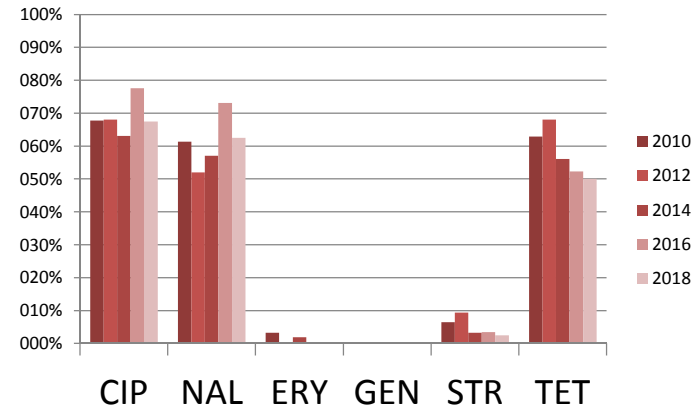
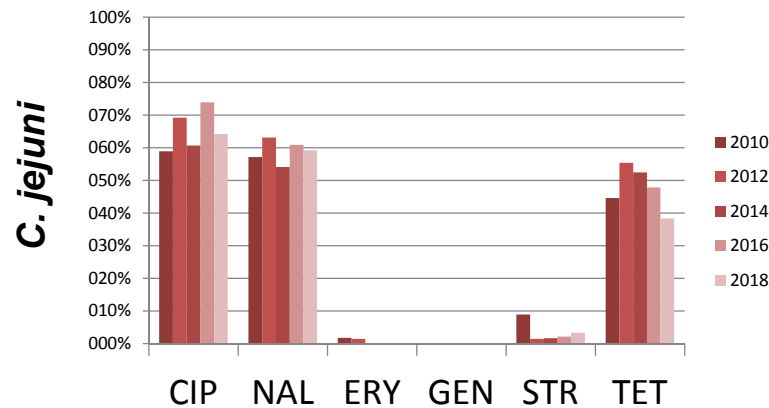
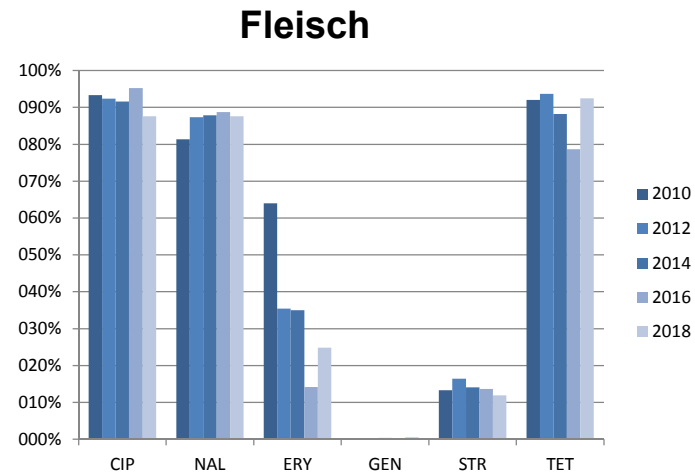
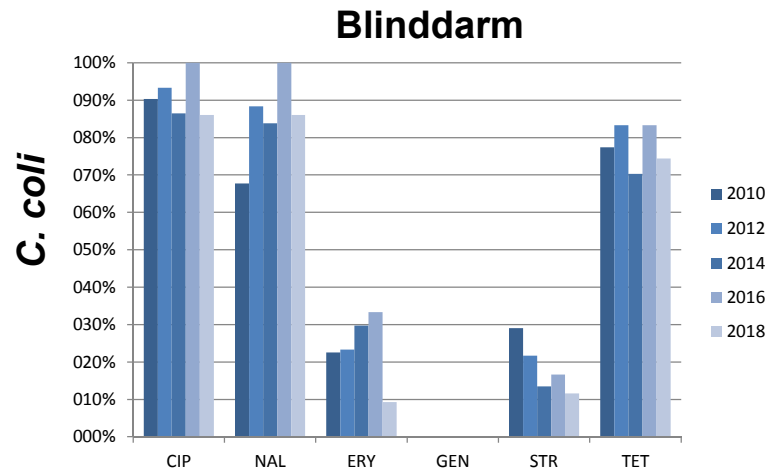
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ERY 128	CIP 16	TET 64	GEN 16	NAL 64	STR 16	ERY 128	CIP 16	TET 64	GEN 16	NAL 64	STR 16
B	ERY 64	CIP 8	TET 32	GEN 8	NAL 32	STR 8	ERY 64	CIP 8	TET 32	GEN 8	NAL 32	STR 8
C	ERY 32	CIP 4	TET 16	GEN 4	NAL 16	STR 4	ERY 32	CIP 4	TET 16	GEN 4	NAL 16	STR 4
D	ERY 16	CIP 2	TET 8	GEN 2	NAL 8	STR 2	ERY 16	CIP 2	TET 8	GEN 2	NAL 8	STR 2
E	ERY 8	CIP 1	TET 4	GEN 1	NAL 4	STR 1	ERY 8	CIP 1	TET 4	GEN 1	NAL 4	STR 1
F	ERY 4	CIP 0.5	TET 2	GEN 0.5	NAL 2	STR 0.5	ERY 4	CIP 0.5	TET 2	GEN 0.5	NAL 2	STR 0.5
G	ERY 2	CIP 0.25	TET 1	GEN 0.25	NAL 1	STR 0.25	ERY 2	CIP 0.25	TET 1	GEN 0.25	NAL 1	STR 0.25
H	ERY 1	CIP 0.12	TET 0.5	GEN 0.12	POS CON	POS CON	ERY 1	CIP 0.12	TET 0.5	GEN 0.12	POS CON	POS CON

Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette Huhn



*Auswertung der Daten auf Grundlage der in dem Jahr gültigen cut-off values (EUCAST)

Antibiotikaresistenzen in der Lebensmittelkette Pute



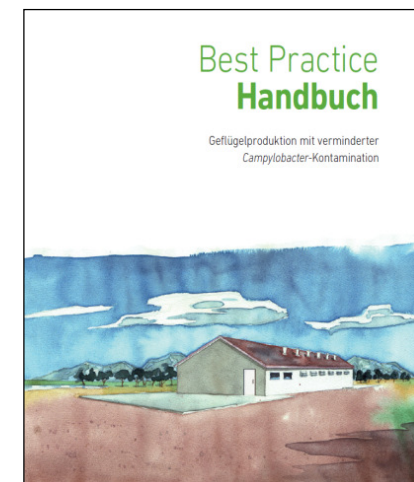
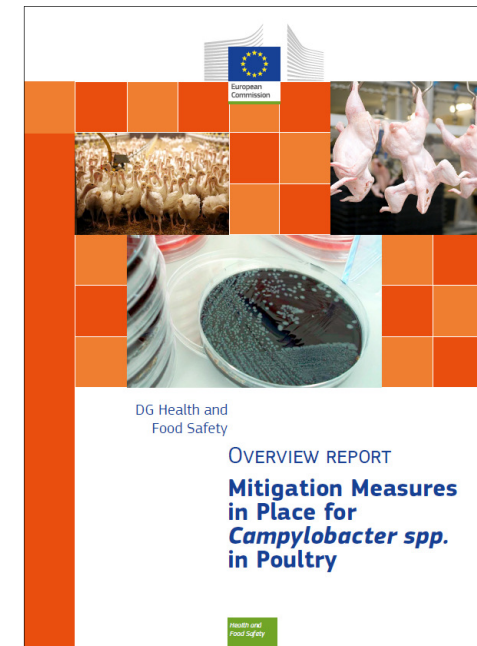
*Auswertung der Daten auf Grundlage der in dem Jahr gültigen cut-off values (EUCAST)

Maßnahmen gegen *Campylobacter*

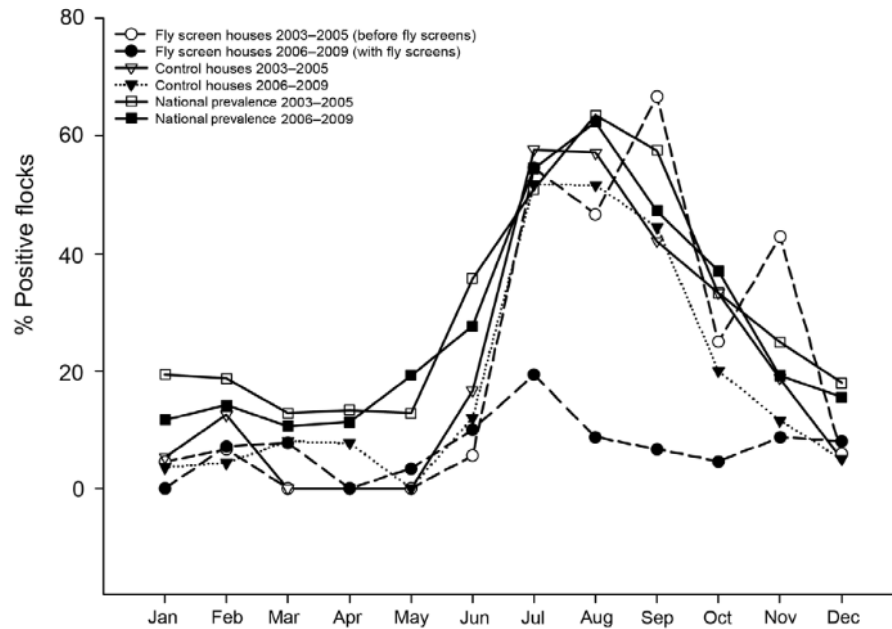
09.01.2018, Europäische Kommission (2017-6260)

„Mitigation measures in place for *Campylobacter* spp. in poultry“

- erhöhte Biosicherheit in der Primärproduktion
 - Installation von Fliegengittern und Netzen bei Lüftungsöffnungen
 - Auf „Vorfang“ verzichten bzw. wesentlich hygienischer gestalten
 - 1-2 Wochen Leerstand zwischen den Mastdurchgängen
 - Weitere Maßnahmen:
Best practice Handbuch und E-learning tools:
<https://www.vetinst.no/camcon-eu>



Maßnahmen – erhöhte Biosicherheit - Fliegengitter



Beispiel Dänemark
Bahrndorff et al., 2013 Emerg. Infect. Dis.

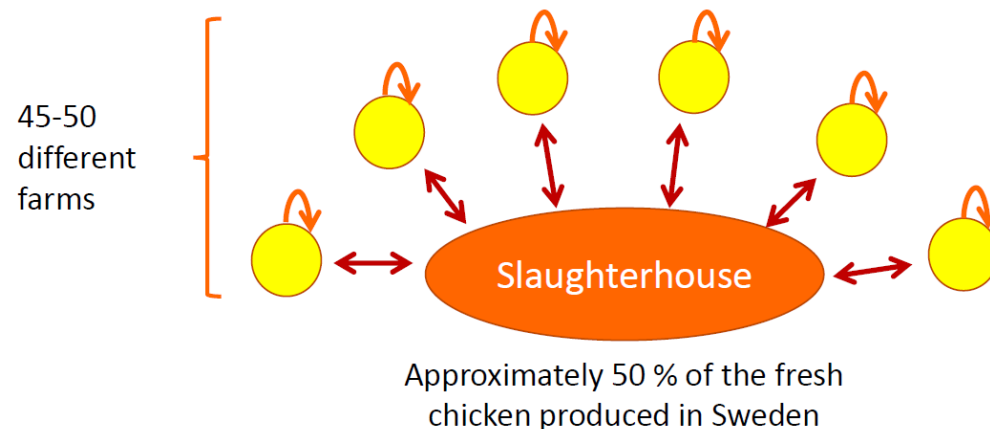
Sommerpeak
fehlt in Ställen mit
Fliegengitter

→ Fliegengitter sind in Ländern mit extensiver Landwirtschaft und relativ kaltem Klima (Dänemark, Island) in Kombination mit zusätzlichen Biosicherheitsmaßnahmen (CamCon – Best Practice Handbuch) sehr erfolgreich

Verschmutzte Transportkisten/Vorfang – Ausbruch in Schweden

Präsentation von Rikard Dryselius, NFA, auf dem EURL-Workshop 2017, Uppsala in Zusammenarbeit mit Hanna Skarin (EURL) und Cia Jernberg (Public Health Agency)

- Anstieg der im Inland akquirierten Campylobacteriose-Fälle (um ca. 50 % in 2014-2016)
- 82 % der klinischen Isolate waren identisch mit einem Sequenztyp aus einem großen Schlachthof



http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/eurl-campylobacter/camp-sweden-rd-2017.pdf

- verschmutzte Transportkisten und Vorfang haben den Klon verschleppt; geringe Stall-Leerzeiten zwischen den Mastdurchgängen hat die Verschleppung manifestiert

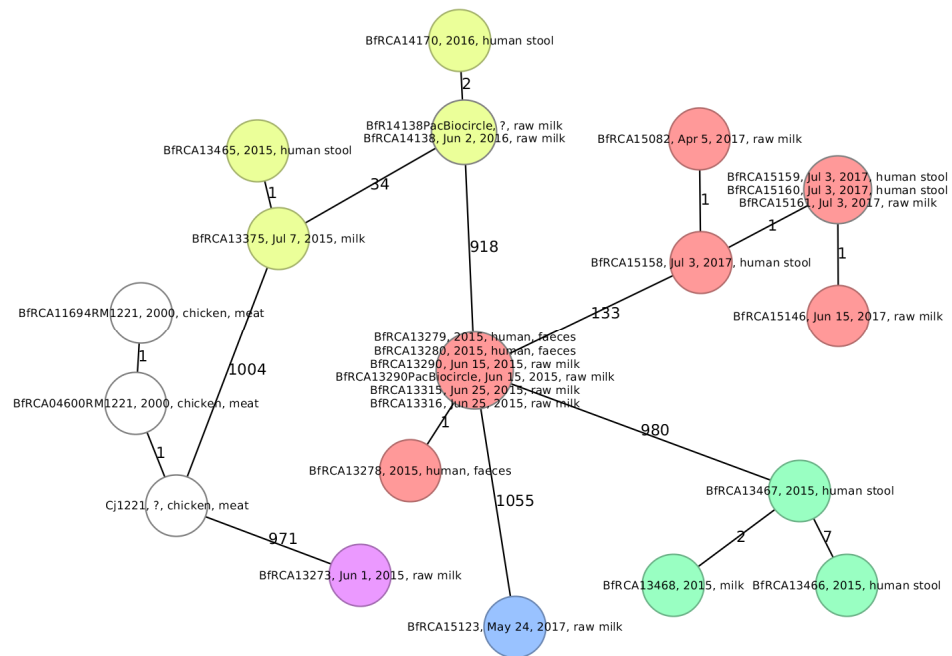
Maßnahmen gegen *Campylobacter* auf dem Schlachthof

- Tiertransport optimieren (Zeit, Tierdichte, Nüchterung, Reinigung der Transportkisten)
- Schlachtgeräte optimieren (Schulung von Mitarbeitern)
 - Feinjustieren gemäß Tiergröße
 - Geringe Kraftausübung beim Rupfen
 - Eviszeration ohne Darmruptur
 - Brühwasser (Temperatur >55 °C/Wasserwechsel/-flussrate)
 - ...

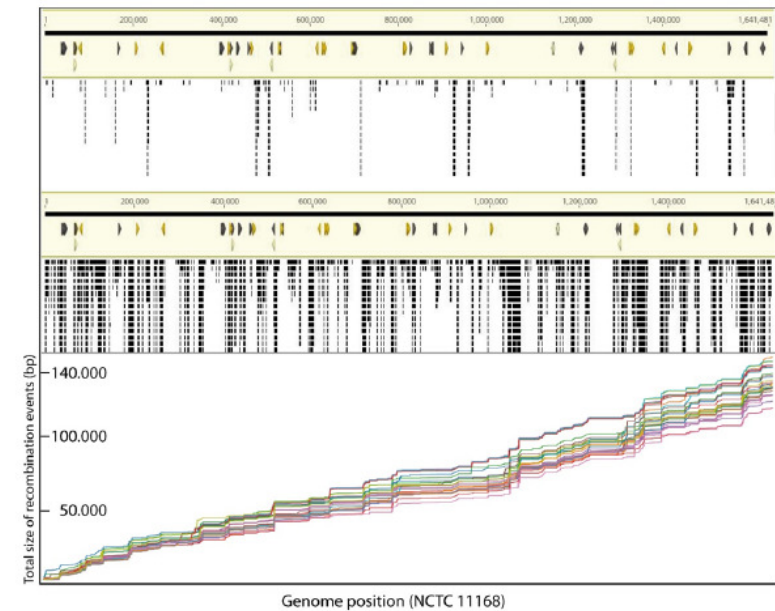
→ Der Vergleich der Performanzen unterschiedlicher Schlachthöfe (PHK) wird Aufschluss über Verbesserungsmaßnahmen im Schlachtprozess geben (Daten der Industrie willkommen!).

Forschungsansätze – Ganzgenomsequenzierung

- Ausbruchsaufklärung (Zusammenarbeit zwischen BfR, RKI und den Länderlaboratorien)
- Rückverfolgung sporadischer Campylobacteriose-Fälle
- Genetische Variabilität → PAC-CAMPY Manuskript (Golz et al., eingereicht) über *C. coli* mit >10 % Genomanteil von *C. jejuni* (Kooperation mit RKI, L. Epping & T. Semmler)



Auswertung von cgMLST und akzessorischer Gene (Ridom SeqSphere+)



Rekombinationsereignisse von *C. jejuni* Sequenzen in spezifischen *C. coli* Isolaten sind über das gesamte Chromosom verteilt, aber nicht zufällig.

Öffentliche Wahrnehmung & Verbraucheraufklärung

https://www.bfr.bund.de/de/nationales_referenzlabor_fuer_campylobacter-8818.html



Food Safety Authority, United Kingdom
<https://www.kaputino.com/2014/06/fsa-warning-to-consumers-that-washing-chicken-spreads-infection/>



DEM KEIM AUF DER SPUR



Danke an...

...die Landesuntersuchungslabore für die Einsendung von Isolaten!

NRL für *Campylobacter*

Christiane Buhler
Julia Golz
Dr. Janine Heise
Marie-Theres Knüver
Dr. Britta Kraushaar
Maja Thieck
Imke Wulsten

FGr. 43

Dr. Katja Alt
PD Dr. Bernd-Alois Tenhagen
Prof. Dr. Annemarie Käsbohrer

FGr. 36

Dr. Ulf Lenski

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim

Dr. Ingrid Huber
Dr. Azuka Iwobi
Janani Govindaswamy

Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Kontakt: kerstin.stingl@bfr.bund.de, 030-18412-24206