

Aufbau einer integrierten molekularen Surveillance der Campylobacteriose

Sangeeta Banerji

Fachgebiet bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen
Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger
Forum für den Öffentlichen Gesundheitsdienst, 20.04.2023



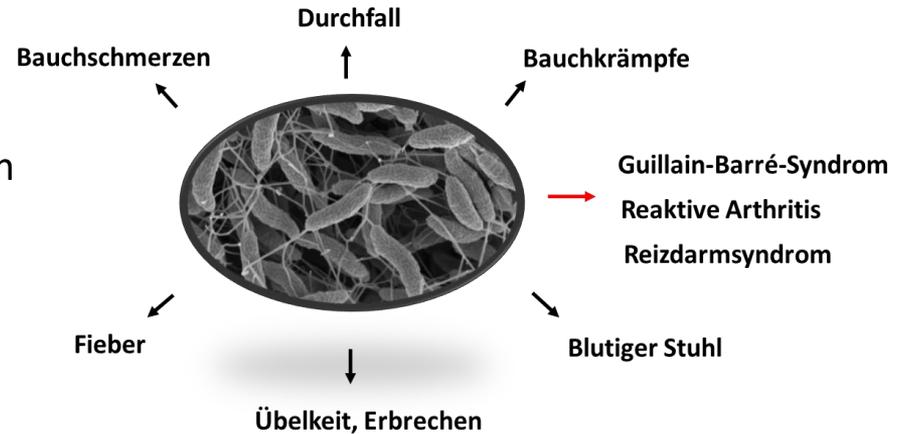
Überblick

- Aufbau der molekularen Surveillance
- Clusterdetektion & Ähnlichkeit mit Isolaten aus Lebensmitteln, Tieren und Umwelt
- Resistenzsurveillance
- Zusammenfassung



Überblick zu *Campylobacter*

- Gram-negativ, spiralförmig, begeißelt
- Wachstum unter microaerophilen Bedingungen
- verursacht Durchfall
- > 26 *Campylobacter* Spezies
- *C. jejuni* und *C. coli* am häufigsten mit Durchfall assoziiert
- Durch Lebensmittel übertragenes Bakterium (Hähnchenfleisch, Rohmilch)



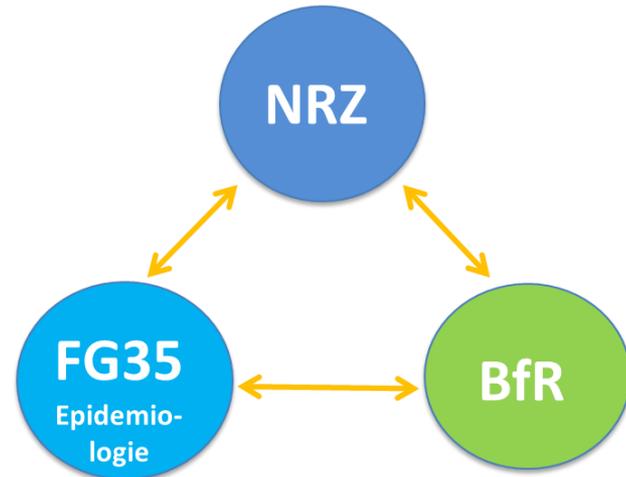
EM Aufnahme, RKI, ZBS4



Integration von molekularen Labordaten mit epidemiologischen und Lebensmittel-Daten für *Campylobacter* Infektionen

Ziele

- Überblick über zirkulierende Stämme
- Zuarbeit bei Ausbruchsuntersuchungen
- Identifizierung potentieller Ausbrüche
- Identifizierung potentieller Lebensmittelquellen
- Reduktion der Fallzahlen





Aufbau einer integrierten molekularen Surveillance für Campylobacteriose

Bundesweite Akquise von klinischen Campylobacter-Isolaten
(ÖGD/primärdiagnostische Labore)

Anzucht + DNA Extraktion

Resistenztestung – Bericht an ECDC

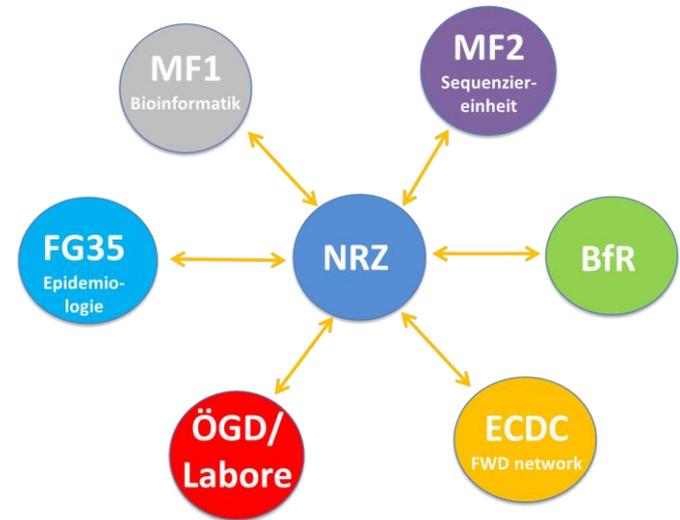
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-summary-report-antimicrobial-resistance-zoonotic-and-indicator-7>

Ganzgenomsequenzierung (MF2/MF1)

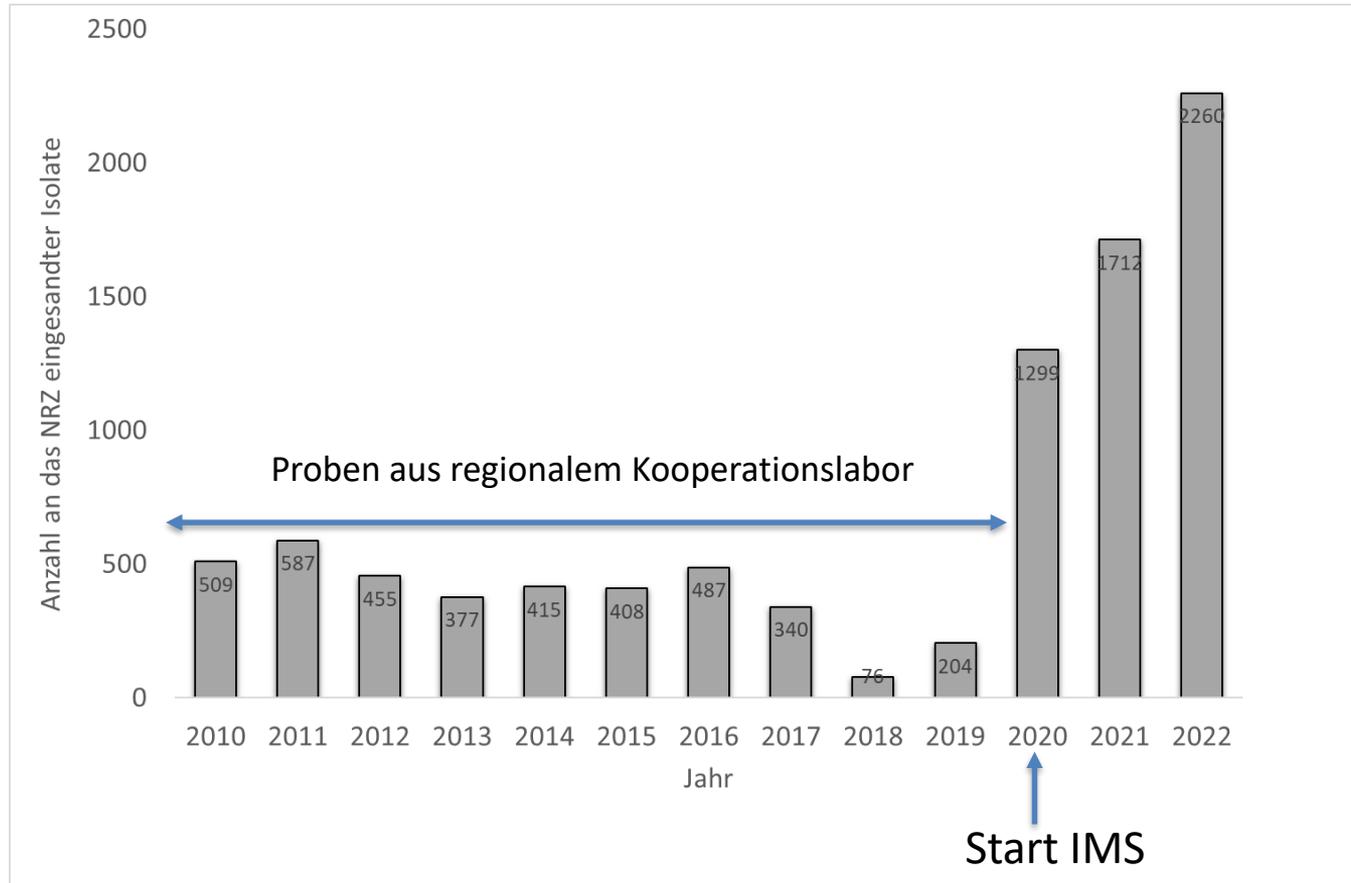
Auswertung mit Software Ridom SeqSphere (cgMLST/
wgMLST)

Ableich mit Meldedefällen (FG35)

Ableich mit Lebensmittelisolaten (BfR – NRL für Campylobacter)

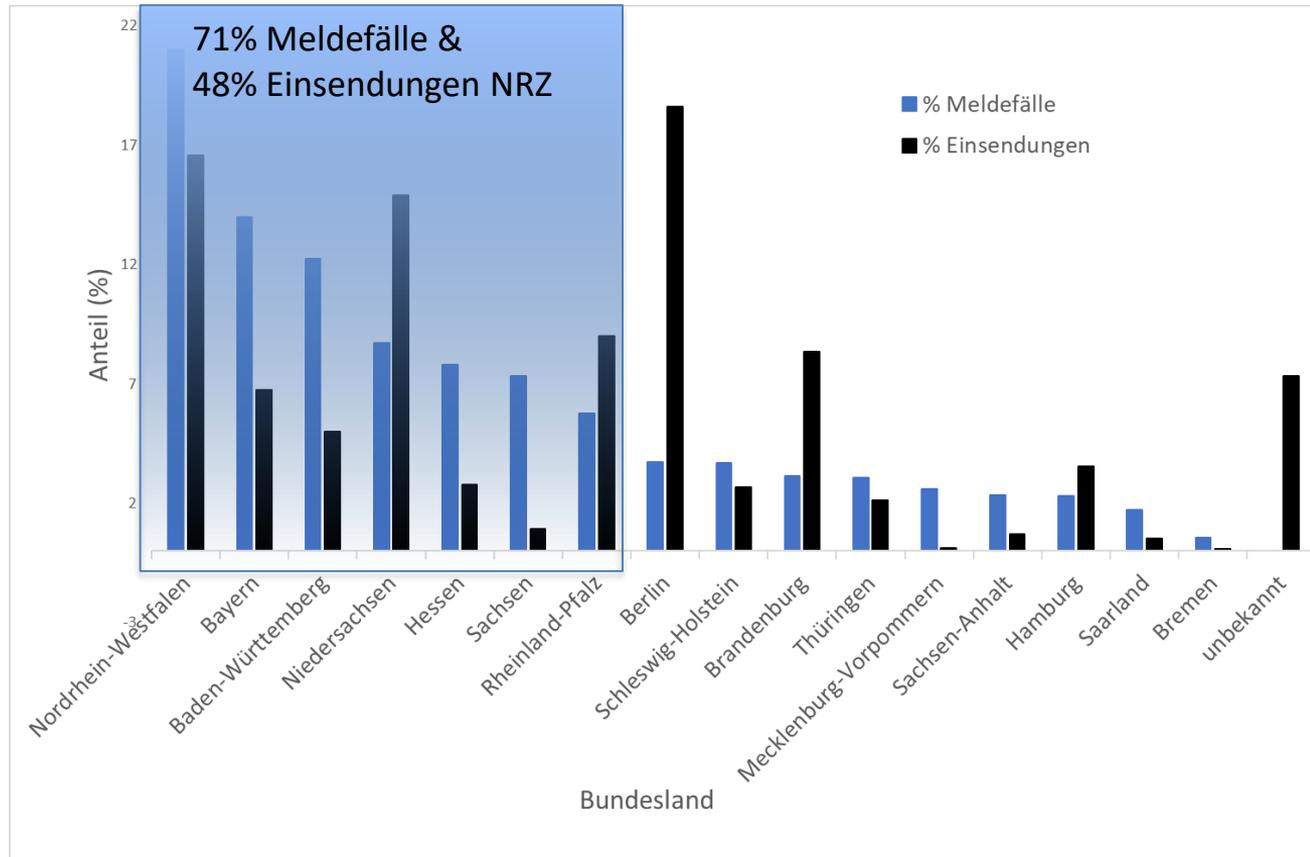


Steigerung der Einsendezahlen durch gezielten Aufruf an Labore



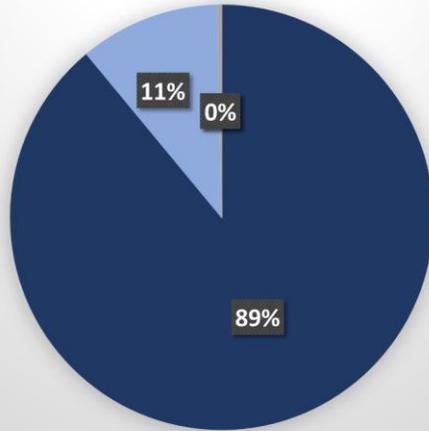


Anteil der Meldefälle (N=53657) und Einsendungen ans NRZ (N=2256) nach Bundesland im Jahr 2022



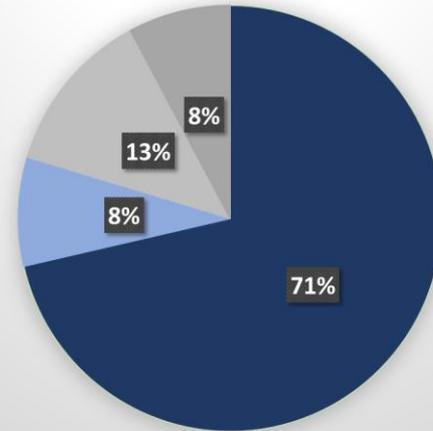


Speziesverteilung von NRZ Isolaten im Vergleich zu den Meldefällen



- Campylobacter jejuni
- Campylobacter coli
- Campylobacter coli/jejuni (nicht differenziert)
- andere Spezies

Einsendungen an das NRZ 2022



- Campylobacter jejuni
- Campylobacter coli
- Campylobacter coli/jejuni (nicht differenziert)
- andere Spezies

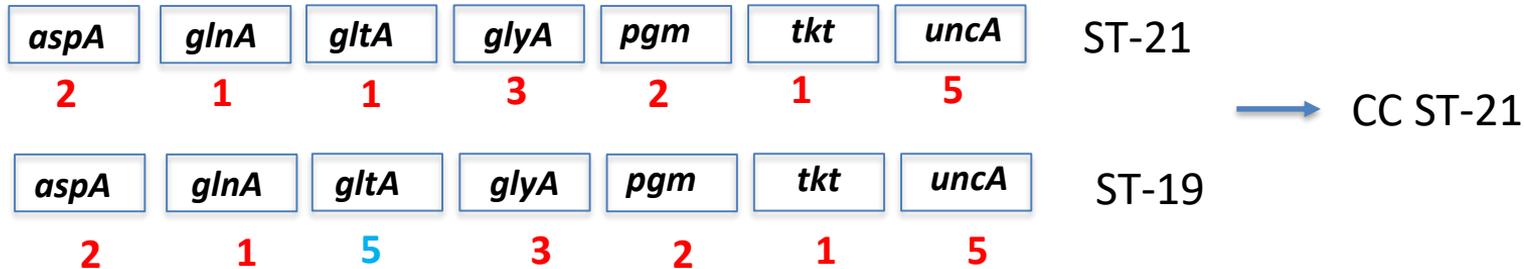
Meldefälle 2022 (SurvStat)



Analyse der Ganzgenomdaten

1) MLST Analyse:

- basiert auf Sequenzierung von 7 Housekeeping Genen
- berücksichtigt nur kodierende Bereiche
- Allel-Varianten unabhängig v. Anzahl der Mutationen in einem Allel
- Unterschiedliche Allel-Kombinationen resultieren in unterschiedliche Sequenztypen (ST) → Clonal Complexes (CC)
- Offizielle Nomenklatur durch PubMLST : [Campylobacter jejuni/coli | PubMLST](#)





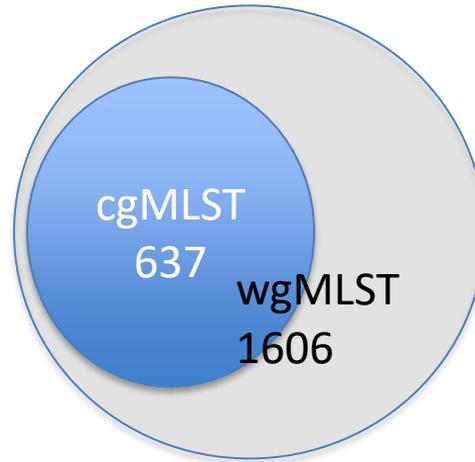
Analyse der Ganzgenomdaten

2) Erweiterte MLST-Analyse (core genome / whole genome MLST)

- cgMLST: kerngenom-basiert: **gemeinsame** Gene eines Sets an Genomen
- wgMLST: **alle** Gene eines Sets an Genomen



Oxford Schema
Cody et al. 2017



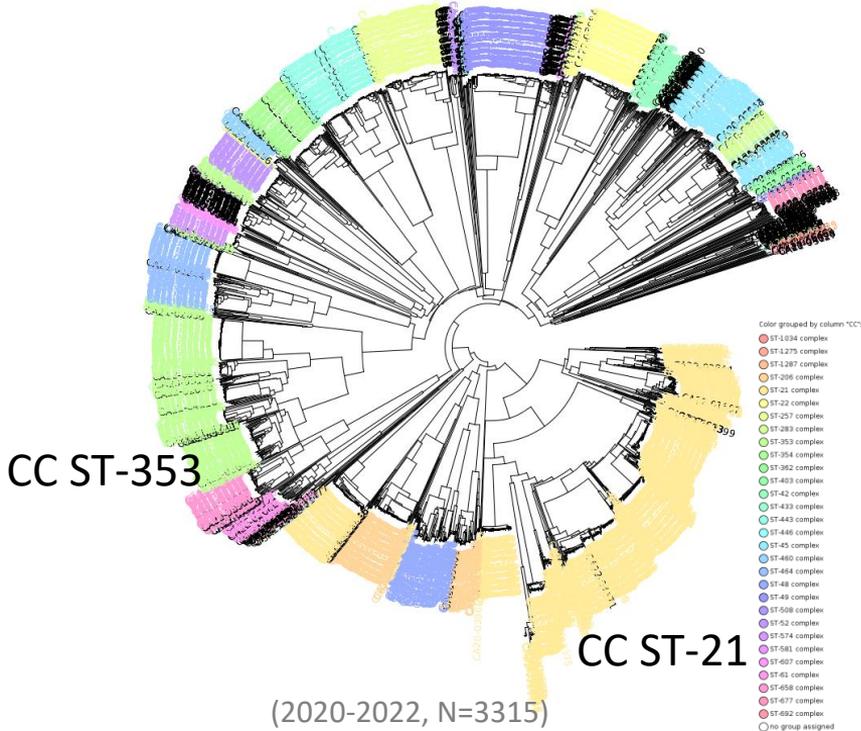
Ridom Schema
Nenning et al. 2021

Grundlage für Cluster-
detektion

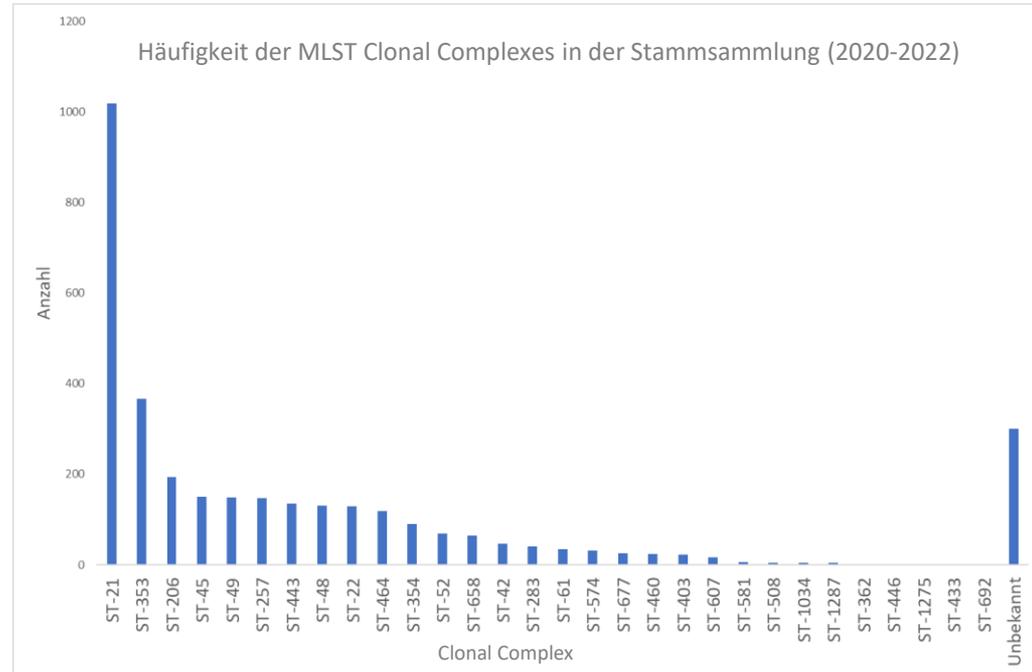
Cluster = genetisch sehr
ähnliche Isolate einer
Spezies, die sich im Falle
von *C. jejuni* in nicht mehr
als 4 Allelen im cgMLST
unterscheiden



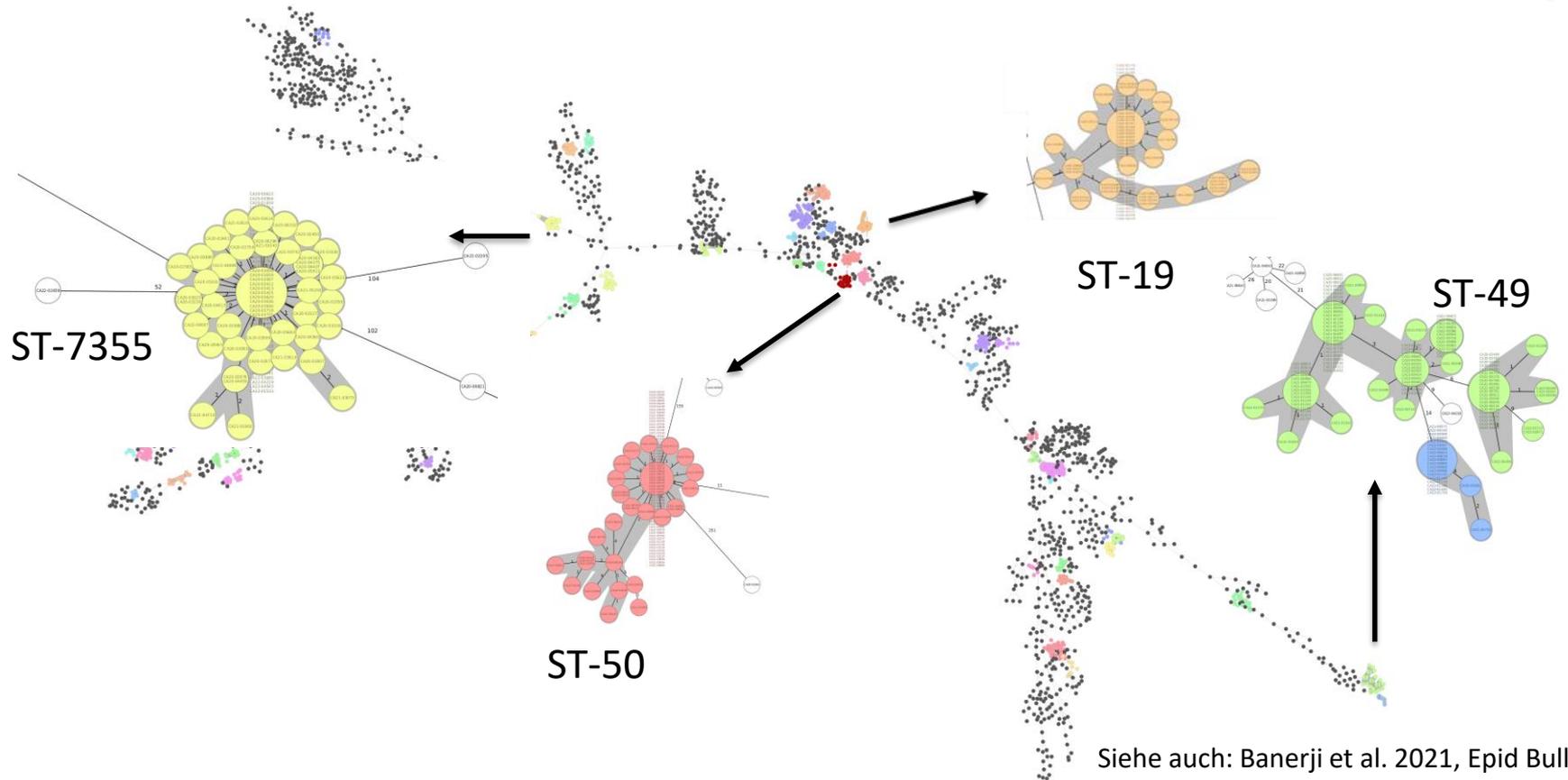
CC ST-21 hauptsächlich mit Campylobacteriose assoziiert



Neighbour Joining Tree basierend auf cgMLST (644 Allele)



Mehrheit der *C. jejuni* Isolate ist Teil eines cgMLST Clusters



Abgleich aller Cluster mit mindestens 25 Isolaten mit BfR Tier- und Lebensmittel Isolaten



Cluster Nummer	ST	Complex Typ	Anzahl Isolate	CC	Zeitliche Häufung	Matches (BfR) wgMLST
1	49	2243	113	ST-49	MÄR 2021 and JAN 2022	Broiler Haut 2021
2	19	1542	104	ST-21	FEB-JUN 2022	Hähnchenfleisch APR-MAI 2022
3	6175	543	86	ST-21	Fühling/Sommer	Hähnchenfleisch 2018-2021
4	50	117	86	ST-21	JUN-AUG 2021	Hähnchenfleisch, Broiler Haut & Blinddarm 2021-2022
5	7355	2151	86	ST-353	JUN-JUL 2020	Hähnchenfleisch, Kalb Kot, Broiler Blinddarm FEB 2019-JUL 2022
6	50	53	85	ST-21	JAN-MAI 2022	Broiler Haut, Blinddarm, Fleischerzeugnis 2022
7	122	2226	62	ST-206	Keine Häufung	Broiler Haut & Hähnchenfleisch 2021 & 2022
8	50	441	50	ST-21	Keine Häufung	Hähnchenfleisch 2022
9	50	1377	50	ST-21	Keine Häufung	Hähnchenfleisch & Putenfleisch 2021-2022
10	464	1428	47	ST-464	Mai 22	Hähnchenfleisch 2021
11	2254	51	41	ST-257	Keine Häufung	Hähnchenfleisch 2014, 2016, 2018, 2020
12	400	219	25	ST-353	Keine Häufung	Broiler Herz, Haut, Blinddarm 2017 & 2020
13	51	3068	25	ST-443	JUL-AUG 2022	Hähnchenfleisch, Pute Blinddarm 2022
14	122	2103	25	ST-206	Keine Häufung	Hähnchenfleisch/ Kalb Kot 2021-2022

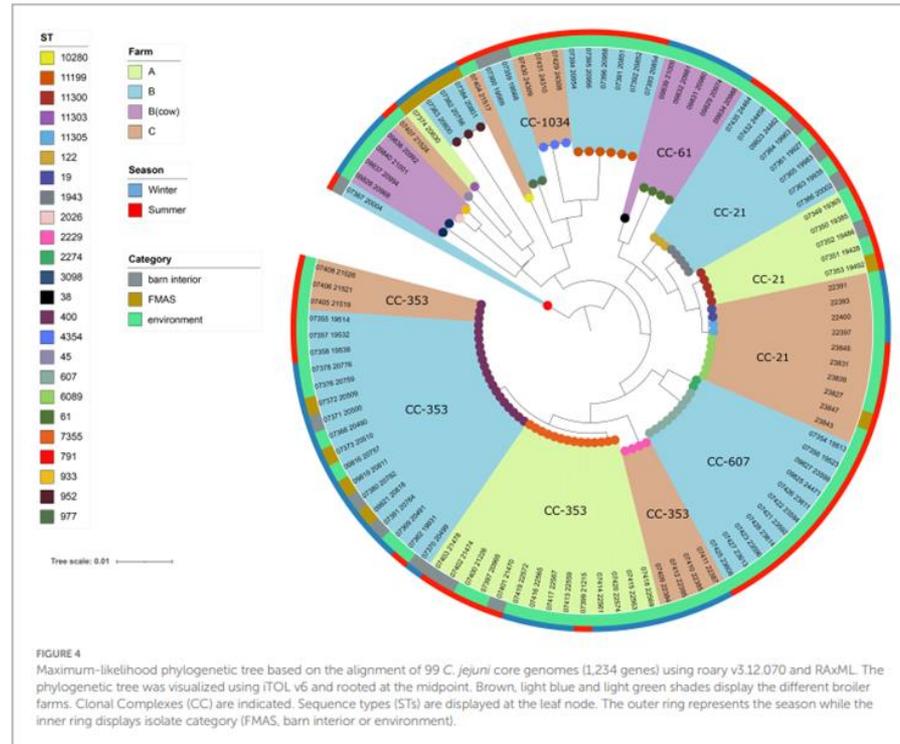


FU-Studie identifiziert CC-21 und CC-353 als häufige Genotypen in *C. jejuni* aus Masthähnchenbetrieben in Brandenburg

Quelle: Reichelt et al. 2022 (FU-Studie)

Reichelt B, Szott V, Epping L, Semmler T, Merle R, Roesler U and Friese A (2022) Transmission pathways of campylobacter spp. at broiler farms and their environment in Brandenburg, Germany. *Front. Microbiol.* 13:982693. doi: 10.3389/fmicb.2022.982693

im Rahmen des Forschungsverbundes PAC-Campy



Beprobung von 3 Masthähnchenbetrieben in Brandenburg, Probenahme 2018-2020

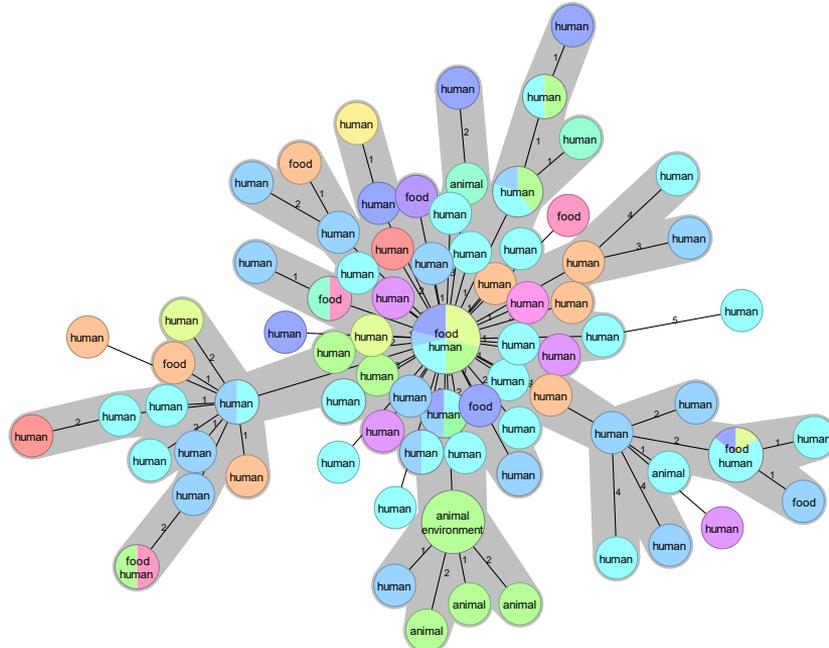


Abgleich der Isolate aus FU-Studie zeigt enge Verwandtschaft mit NRZ Isolaten aus Erkrankungsfällen

Cluster Nummer	ST	Complex Typ	Anzahl Isolate	CC	Zeitliche Häufung
1	49	2243	113	ST-49	MÄR 2021 and JAN 2022
→ 2	19	1542	104	ST-21	FEB-JUN 2022
3	6175	543	86	ST-21	Fühling/Sommer
4	50	117	86	ST-21	JUN-AUG 2021
→ 5	7355	2151	86	ST-353	JUN-JUL 2020
6	50	53	85	ST-21	JAN-MAI 2022
7	122	2226	62	ST-206	Keine Häufung
8	50	441	50	ST-21	Keine Häufung
9	50	1377	50	ST-21	Keine Häufung
10	464	1428	47	ST-464	Mai 22
11	2254	51	41	ST-257	Keine Häufung
→ 12	400	219	25	ST-353	Keine Häufung
13	51	3068	25	ST-443	JUL-AUG 2022
→ 14	122	2103	25	ST-206	Keine Häufung



Nachweis eng verwandter Isolate aus Masthähnchenbetrieben (FU-Studie) und Zoonosemonitoring (BfR) mit NRZ Isolaten aus Erkrankungsfällen



Ridom SeqSphere+ MST for 119 Samples based on 1602 columns, pairwise ignoring missing values

Distance based on columns from C. jejuni/coli MLST (7), C. jejuni/coli cgMLST (637), C. jejuni/coli Accessory (958)

MST Cluster distance threshold: 4

Nodes colored by column: State of Isolation

Comparison Table created: 17.04.2023 16:29 (v8.5.1_(2022-11))

Projects: Campy_ST7355_CT2151 (Campylobacter jejuni/coli)

C. jejuni/coli cgMLST Complex Type / Clustering Distance: 13

For citing correctly in publications the tools used for this analysis see menu Help | Citations and Licenses.

Cluster distance threshold: 4

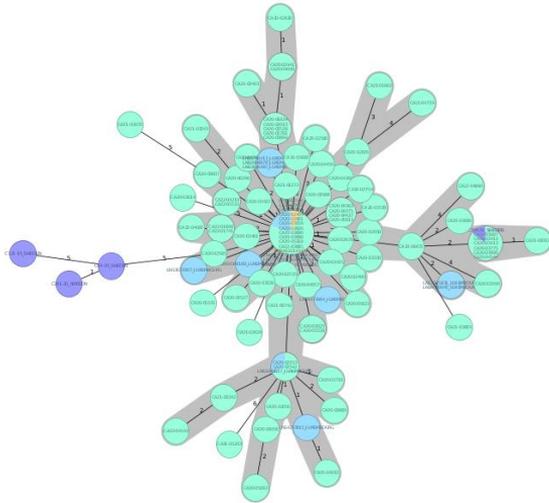
Color grouped by column "State of Isolation":

- - unbekannt -
- Baden-Württemberg
- Bayern
- Berlin
- Brandenburg
- Hessen
- Mecklenburg-Vorpommern
- Niedersachsen
- Nordrhein-Westfalen
- Rheinland-Pfalz
- Saarland
- Sachsen
- Schleswig-Holstein
- Thüringen

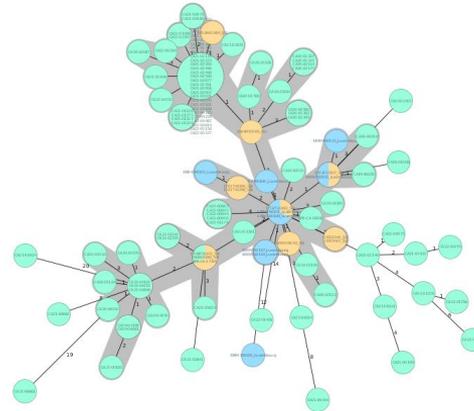
ST 7355 wgMLST Cluster besteht aus: 14 Lebensmittelproben (2019-2022, hauptsächlich 2020), 13 Tierproben (2019-2022, hauptsächlich 2019), 3 Umweltproben (2019) und 86 Humanproben (2020-2022, hauptsächlich 2020): gute zeitliche Übereinstimmung, aber geographisch divers!



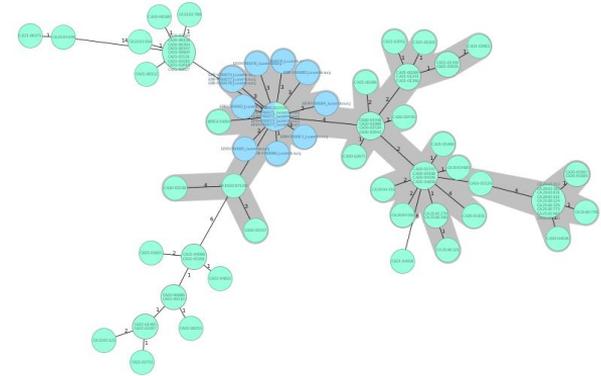
Drei Cluster kommen in auch Nachbarländern vor



ST-7355
CC ST-353



ST-6175
CC ST-21



ST-2254
CC ST-257



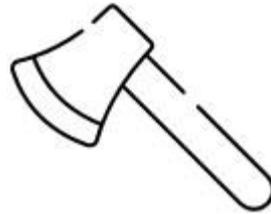
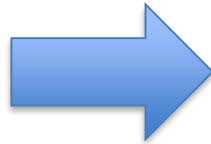
ST-2254 und ST-6175 als immer wieder auftretende Stämme (Lineage) in Luxemburg beschrieben (Nenning et al. 2021)!

Hypothese: Ursprung der klinischen Stämme sind Aufzuchtbetriebe



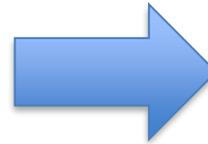
<https://stock.adobe.com/de/>

Zuchtbetrieb



<https://stock.adobe.com/de/>

Schlachtung



<https://stock.adobe.com/de/>

Lebensmittel

Geflügelfleisch in Supermarktketten stammt von einigen wenigen Großzüchtern!



Surveillance der Antibiotikaresistenzentwicklung

- Antibiotika der Wahl: Ciprofloxacin oder Azythromycin
- Bereits >70% aller Isolate resistent gegenüber Ciprofloxacin (WHO high Priority)

WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics

Priority 1: CRITICAL

- *Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant
- *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant
- *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant, ESBL-producing

Priority 2: HIGH

- *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant
- *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and resistant
- *Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant
- *Campylobacter* spp., fluoroquinolone-resistant
- *Salmonellae*, fluoroquinolone-resistant
- *Neisseria gonorrhoeae*, cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

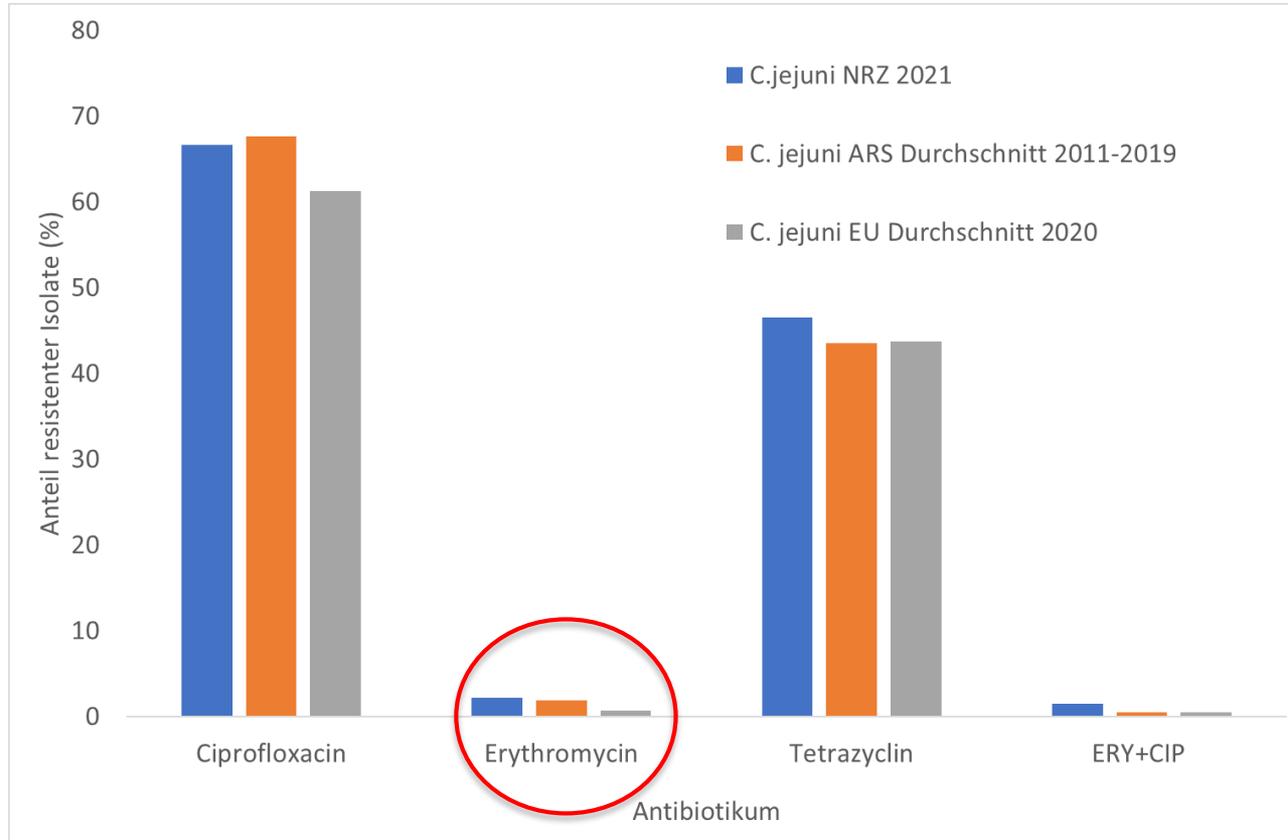
Priority 3: MEDIUM

- *Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible
- *Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant
- *Shigella* spp., fluoroquinolone-resistant

Quelle: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>



70% der klinischen *C. jejuni*-Isolate sind resistent gegenüber Fluoroquinolonen



The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020

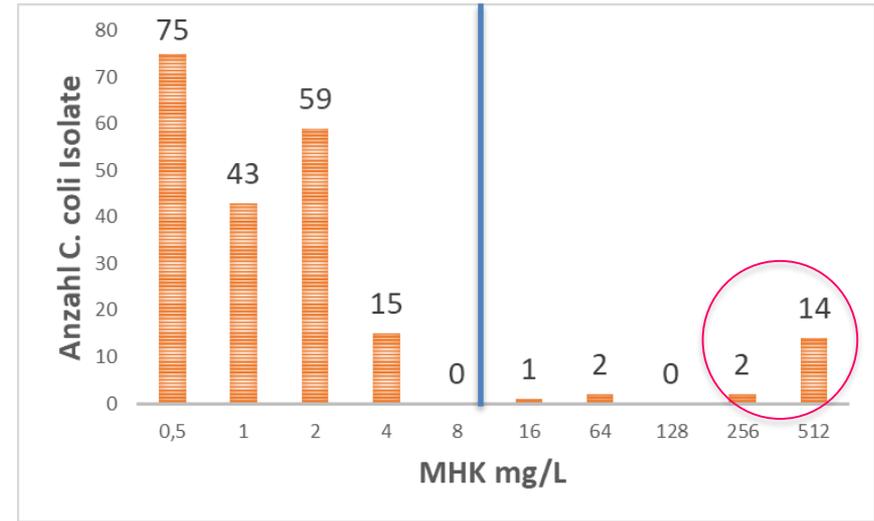
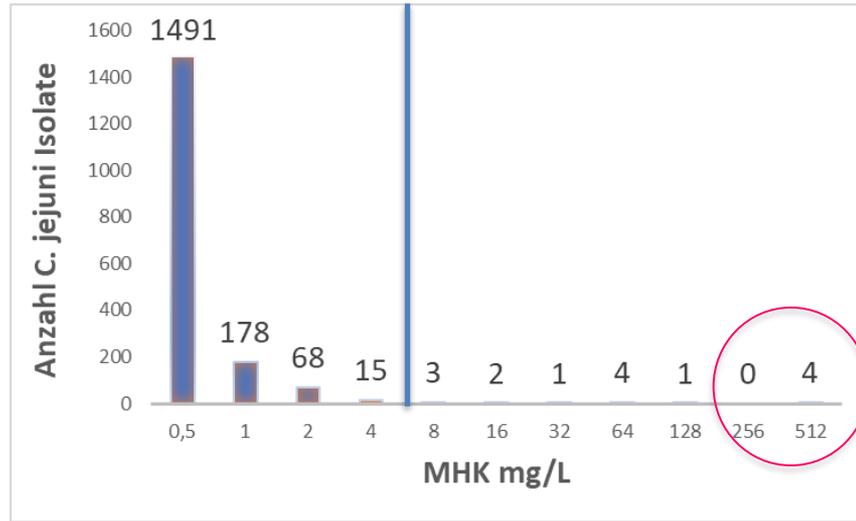
Surveillance report

Die rRNA Methyltransferase Erm(B)



- Ursprung: Gram-positive Bakterien
- *Erstmals 2014 in C. coli Stämmen aus China beschrieben*
- *Gen befindet sich häufig auf Plasmiden oder MDRI*
- *Gen ist leicht übertragbar durch HGT*
- *Bisher trotzdem hauptsächlich im asiatischen Raum beschrieben und nur vereinzelt in Europa*
- *In Deutschland noch keine Studie zur Verbreitung in klinischen Stämmen*
- *Verleiht hohe MHK >256 mg/L!*

Untersuchung von *Campylobacter* spp. mit hoher ERY MHK auf das *erm(B)* Gen



Von vier *C. jejuni* bzw. 16 *C. coli* Stämmen aus dem Jahr 2022 mit ERY MHK ≥ 256 mg/L waren ein *C. jejuni* Stamm und zwei *C. coli* Stämme PCR positiv auf *erm(B)*.



Zusammenfassung

- Erfolgreiche Etablierung einer molekularen *Campylobacteriose*-Surveillance
- Einige wenige Sequenztypen dominieren deutschlandweit (europaweit?)!
- Dominante Clustertypen treten z.T. zeitlich gehäuft und wiederkehrend auf
- Wahrscheinlichste Eintragsquelle: Hühnerfleisch und Hühnerfleischprodukte
- Fast 70% der *C. jejuni* Isolate sind Fluorochinolon resistent (WHO high priority)
- *erm(B)* Gen tritt auch in klinischen Isolaten aus Deutschland auf



Danksagung

- Antje Flieger und Angelika Fruth
- Christiane Schmidt und Petra Hahs (FG11)
- Allen anderen FG11 Mitarbeitenden
- Torsten Semmler sowie MF2 & MF1
- Bettina Rosner (FG35)
- Werner Espelage, Marcel Feig, Ines Noll, Tim Eckmanns (FG37)
- Andreas Tille, Bernd Reinhardt, Michael Voigt, Wolfgang Erlemeyer (MFI)
- Martin Mielke
- Kerstin Stingl (BfR)
- Anika Friese (FU)



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!