

Ausbruchsuntersuchungen zu *Campylobacter* in Rohmilch

Dr. Kerstin Stingl

Abteilung Biologische Sicherheit
Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*

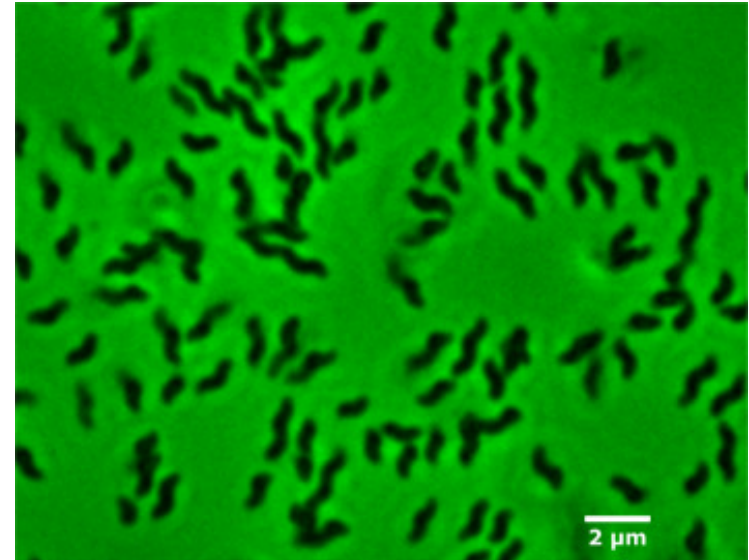
Campylobacteriose beim Menschen

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

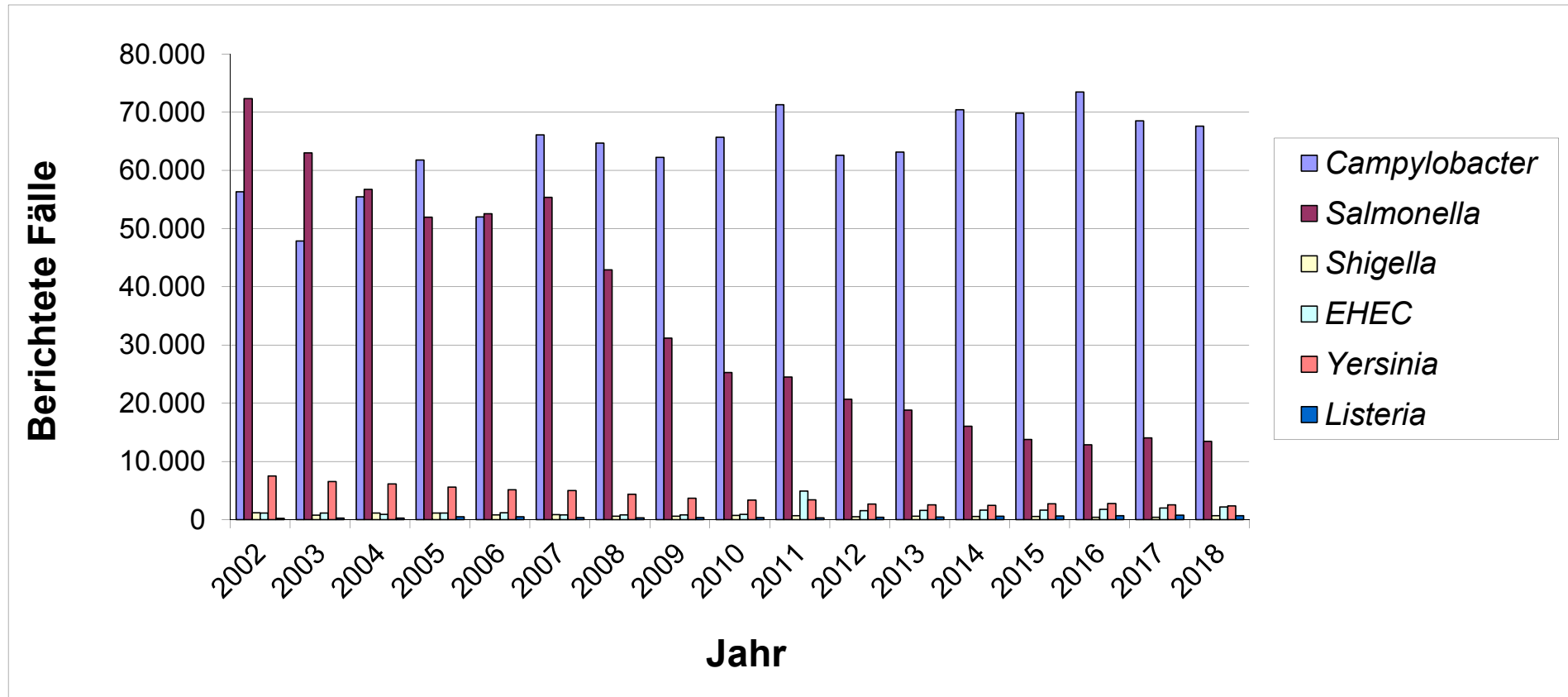
Postinfektiöse Komplikationen (~1-6 Wochen nach Akutinfektion; Keithlin et al. BMC Public Health 2014)

- 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)



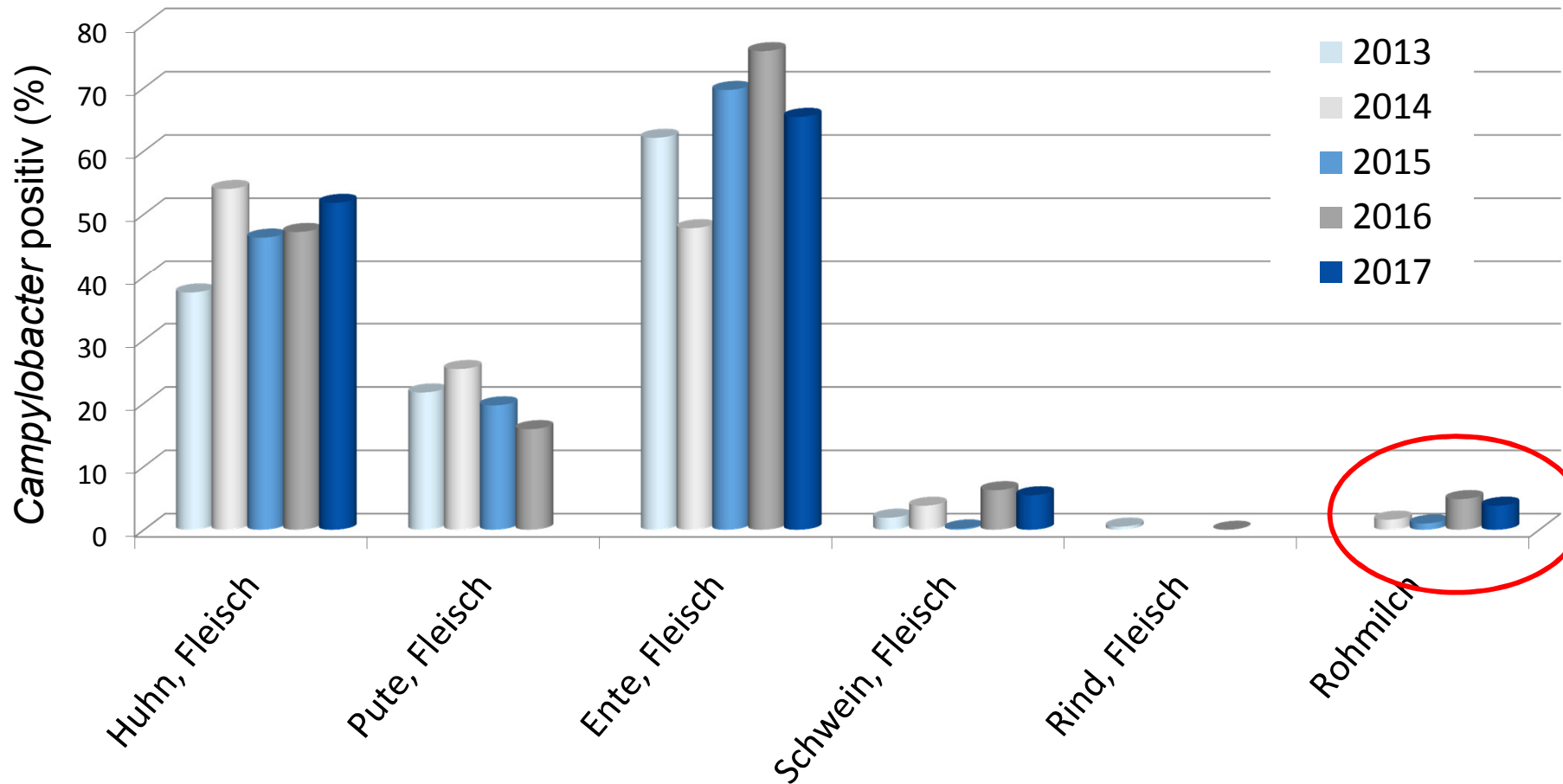
Campylobacteriose in Deutschland – aktuelle Situation



Berichtete *Campylobacter* Infektionen beim Menschen in Deutschland (Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin, 03/2003-03/2019)

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

Prävalenzen von *Campylobacter* in Lebensmitteln



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

***Campylobacter* Ausbrüche mit Rohmilch**

- Wegfall der Milchquote ab April 2015
- Verstärkte Direktvermarktung von Rohmilch über sogenannte Milchtankstellen
- 88 Milchtankstellen in 2016 (BVL)
- Risikobewertung des BfR Nr. 008/2016



Platzhalter Milchautomat

www.ksta.de (Kölner Stadtanzeiger)



Platzhalter Milchtankstelle

www.bauernhofurlaub.de

Werbung im Internet (Zugriff 11.03.2019)

- 241 Milchtankstellen in DE
<http://milchtankstellen.com>
- 243 Milchtankstellen in DE
<https://www.mein-bauernhof.de>



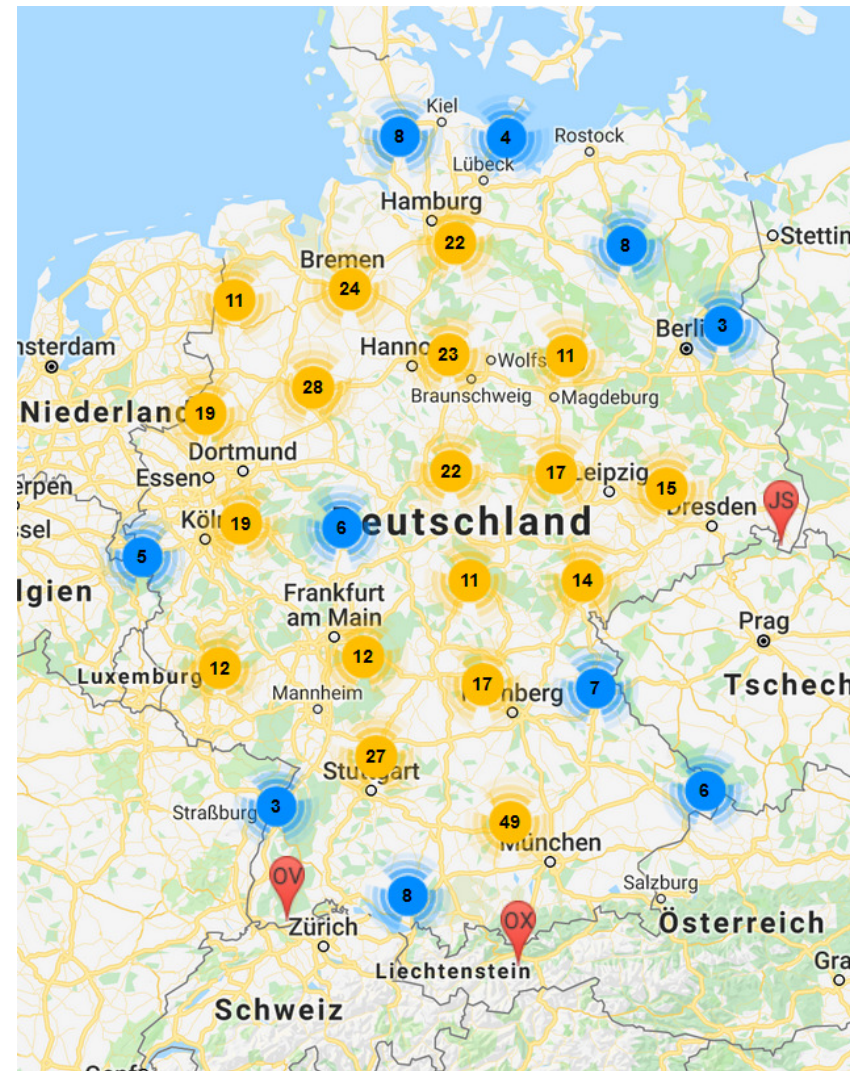
Werbung im Internet (Zugriff 11.03.2019)

- 414 Milchtankstellen in DE

<https://milchautomaten-direktvermarkter.de/>

„Finden Sie ihren Milchautomaten, Milchtankstelle, Milchzapfstelle für melkfrische Rohmilch“

„Probieren Sie es aus, kaufen Sie an der Milchtankstelle, dem Milchautomaten oder im Hofverkauf auf dem Bauernhof ein gesundes unverfälschtes Naturprodukt.“



Werbung versus Warnung

<https://www.moderne-landwirtschaft.de/milchtankstellen-frische-milch-rund-um-die-uhr>

„Die Anlage erfüllt außerdem die Auflagen der Veterinär- und Lebensmittelaufsicht.“[...]“ Im Raum findet sich auch ein Schild, das Besucher darauf hinweist, dass es sich bei der Milch in der Tankstelle um Rohmilch handelt. Das ist für manchen eine Köstlichkeit, aber nicht für jeden Magen geeignet. Daher sollte sie vor dem Genuss abgekocht werden.“

MILCHTANKSTELLEN

Hygienemängel: Frische Milch aus dem Automaten häufig mit Keimen belastet



<https://www.shz.de> (Schleswig-Holsteinischer Zeitungsverlag)

Übersicht über *Campylobacter* Infektionen in Verbindung mit Rohmilch

RKI/BVL (Deutschland)

In 2017 wurden 389 lebensmittelbedingte Ausbrüche gemeldet

→ davon der größte Anteil mit 38 % im Zusammenhang mit *Campylobacter*

→ wenn das ursächliche Lebensmittel in diesen Fällen ermittelt werden konnte, war es Rohmilch

EFSA (Europa)

In 2017 waren 10,3 % der gesamten bakteriellen Ausbrüche (mit starker Evidenz) auf *Campylobacter* zurückzuführen. Auch hier wird überwiegend als ursächliches Vehikel Rohmilch genannt.

...häufig fehlt entweder das Isolat aus Rohmilch oder vom Patienten für einen molekularen Abgleich!

Detektion von *Campylobacter* in Rohmilch

- ISO 10272-1:2017 Validierung: LOD₅₀ in Rohmilch entspricht ~60 KbE/10 ml (Biesta-Peters et al. 2019)
 - LVU 2015 ausgerichtet durch das NRL „Quantifizierung und Detektion von *Campylobacter* in Rohmilch“ für 25 Teilnehmer*innen
- Ergebnis der LVU: bei der qual. Detektion waren 22/25 Labore exzellent, 3 gut

...gibt es überhaupt ein Detektionsproblem für *Campylobacter* in Rohmilch?

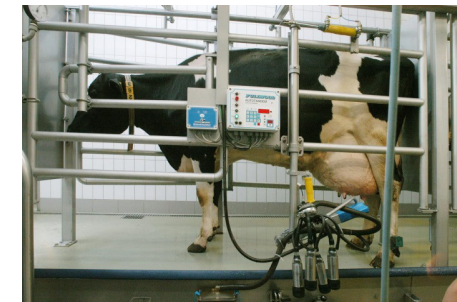


Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method

Elisabeth G. Biesta-Peters^a, Ida Jongenburger^{a,1}, Enne de Boer^{a,1}, Wilma F. Jacobs-Reitsma^{b,*}

^a Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Consumer and Safety Division, Laboratory for Food and Feed Safety, Akkermaalsbos 2, 6708 WB Wageningen, The Netherlands

^b RIVM National Institute for Public Health and the Environment, Centre for Zoonoses and Environmental Microbiology, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, 3721 MA Bilthoven, The Netherlands



2015: LVU mit Rohmilch vom Versuchsgut des BfR

Überleben von *Campylobacter* in Rohmilch

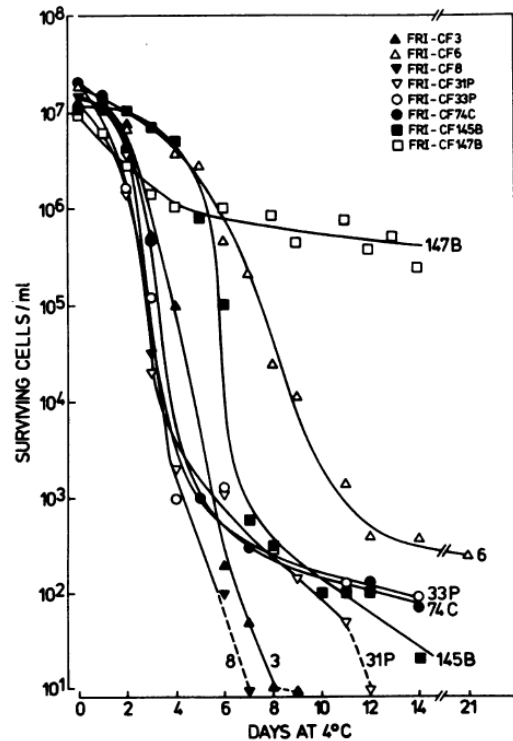


FIG. 1. Survival of *C. jejuni* and NARTC in unpasteurized milk held at 4°C. —, —, —, No campylobacters were detected at the <10-CFU/ml level (minimum level of sensitivity) in the final sampling.

Doyle et al., 1982 Appl. Environ. Microbiol.

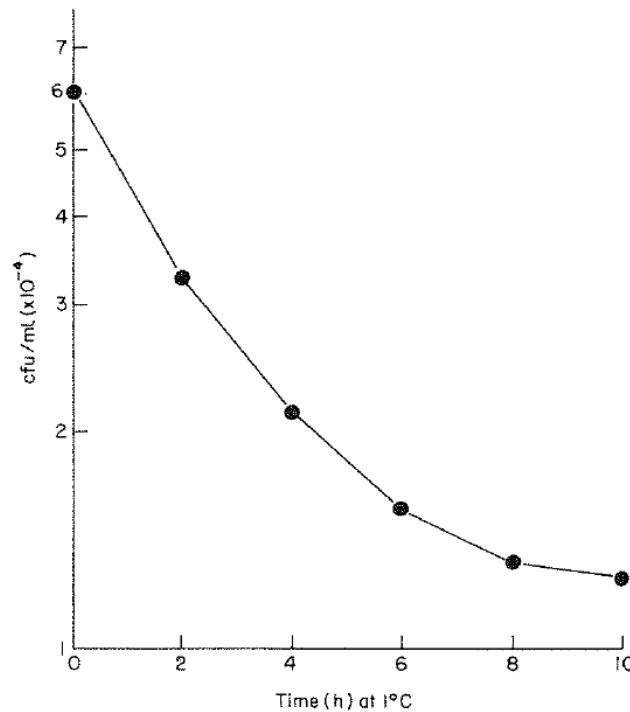


Fig. 1. The viability of *Campylobacter jejuni* in raw milk stored at 1°C. The cfu/ml was calculated after 48 h incubation at 43°C.

→ stammspezifische Reduktion der KbE innerhalb kurzer Zeit (10 h bis 21 Tage)

Humphrey et al., 1986 J. Appl. Bacteriol.

Detektion von *Campylobacter* in Rohmilch und Milchfiltern

- Artursson et al. 2018 Int. J. Food Microbiol. (EU-RL, Uppsala) bestätigt höhere Detektionsrate von *Campylobacter* (und anderen Pathogenen) in Milchfiltern vs. Rohmilch (Transport in Cary Blair Medium)

Test Parameter	Percentage Detection Rate ^a	
	Raw Milk Filters	Raw Milk
<i>L. monocytogenes</i> (Detection Only)	20% (38/190)	7% (15/208)
<i>Campylobacter</i> spp.	22% (42/190)	3% (6/200)
VTEC (O157 and O26) ^b	6% (12/190)	Not Tested
<i>Salmonella</i> spp.	1% (2/185)	0.5% (1/206)
More than one pathogen detected in same sample	8% (15/190)	0

Food Safety Authority, Ireland 2015

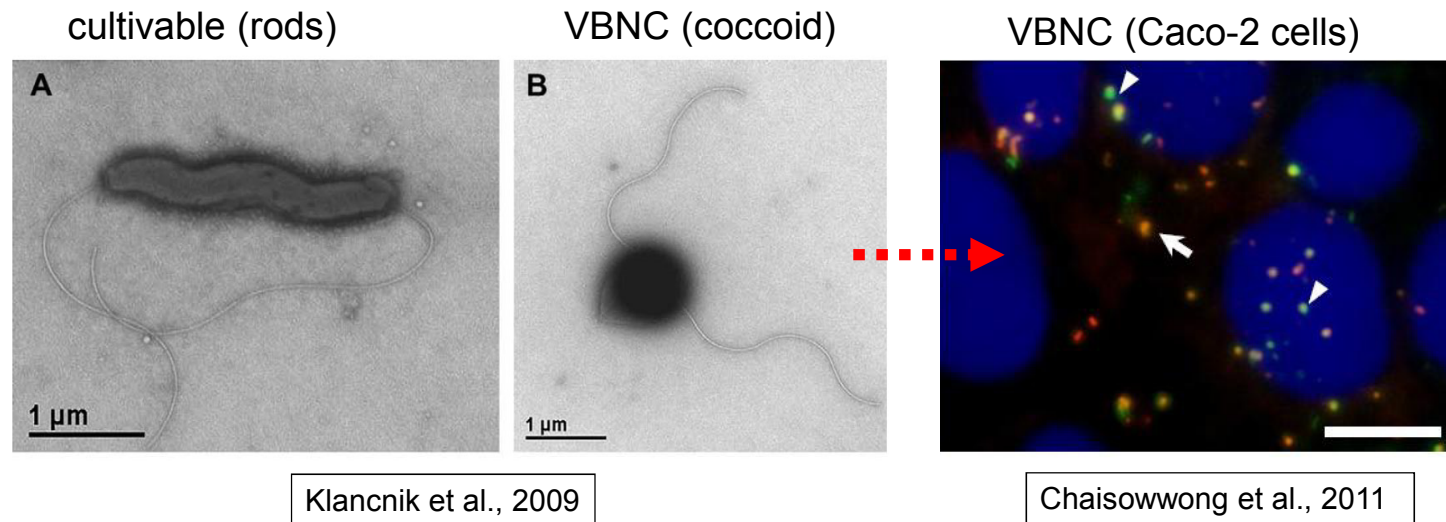
Table 3. Weighted percent of US dairy operations that were positive for *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, or *C. lari*) by real-time PCR and culture in bulk tank milk (n = 234 operations) and milk filters (n = 231 operations)

Sample type and result	PCR			Culture		
	Number	Weighted %	SE	Number	Weighted %	SE
Positive milk	27	9.8	2.3	14	3.0	1.1
Positive filter	69	20.5	3.0	33	10.6	2.3
Positive milk and positive filter	16	5.3	1.8	4	1.2	0.9
Negative milk and positive filter	53	15.1	2.5	29	9.4	2.1
Positive milk and negative filter	9	4.3	1.7	9	1.8	0.7
Positive milk and no filter sample	2	0.2	0.1	1	0.1	0.1
Any positive sample	80	24.9	3.3	43	12.5	2.4

Del Collo et al. 2017

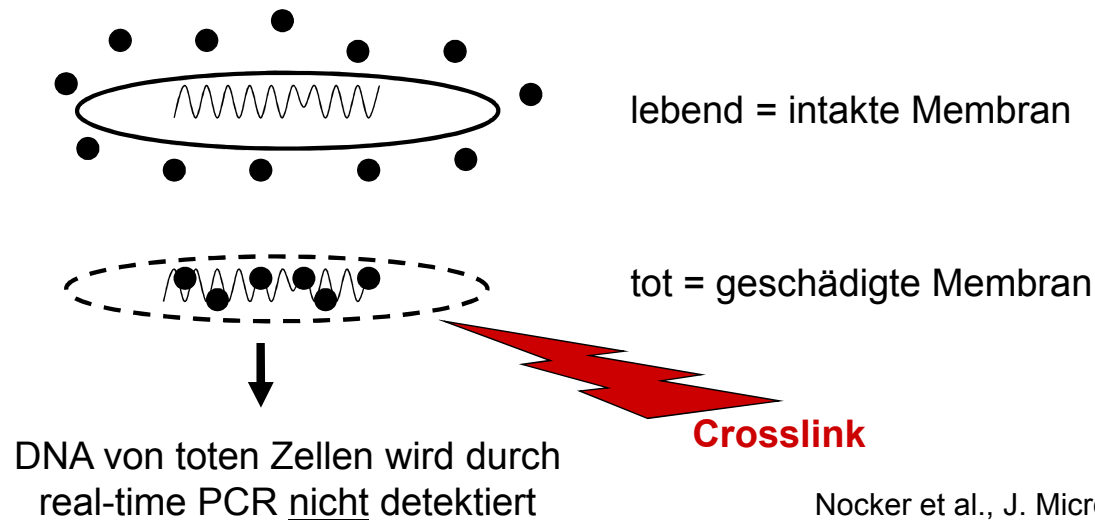
→ ZoMo-Nat: Rohmilchproben innerhalb von 24 h im Labor ansetzen; besser wären Milchfilter als Probetyp (praktikabel?)

Campylobacter – VBNC-Status (lebend, aber nicht kultivierbar)



- Viele Beispiele in der Literatur, dass der Parameter KbE die Lebensfähigkeit vor allem von „anspruchsvollen“ Pathogenen unterschätzt (Review: Li et al., 2014, Pinto et al., 2015)
- kultivierungsunabhängige Detektionsmethoden entwickeln und/oder Bedingungen zum „Aufwecken“ finden

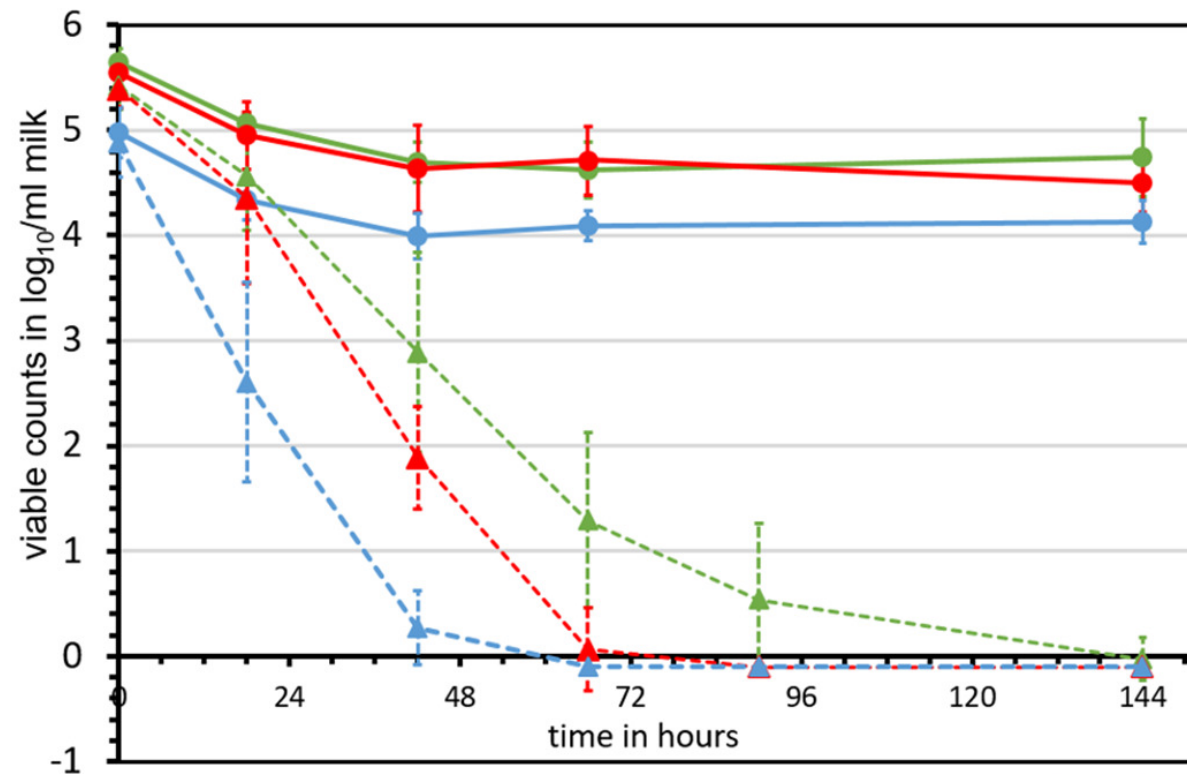
PCR-basierter Lebendnachweis entlang der Lebensmittelkette



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

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

Das Überleben von *Campylobacter* in Rohmilch scheint unterschätzt



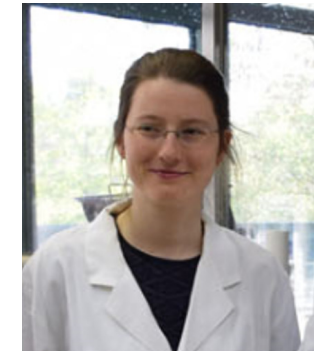
lebend qPCR



max. Δ 4,5 log10

KbE

(ISO 10272-2; 42 °C, 5 % O₂, 10 % CO₂)



Imke F. Wulsten

C. jejuni BfR-CA-13290

—▲— cfu —●— qPCR (PMA)

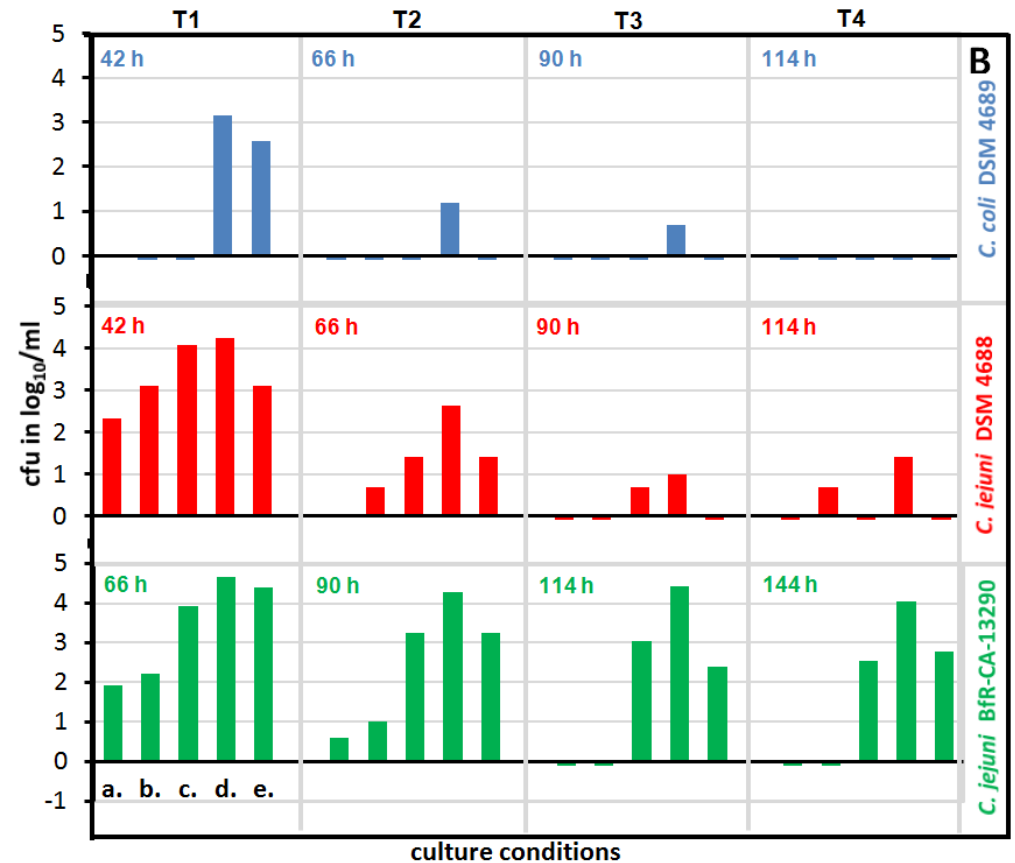
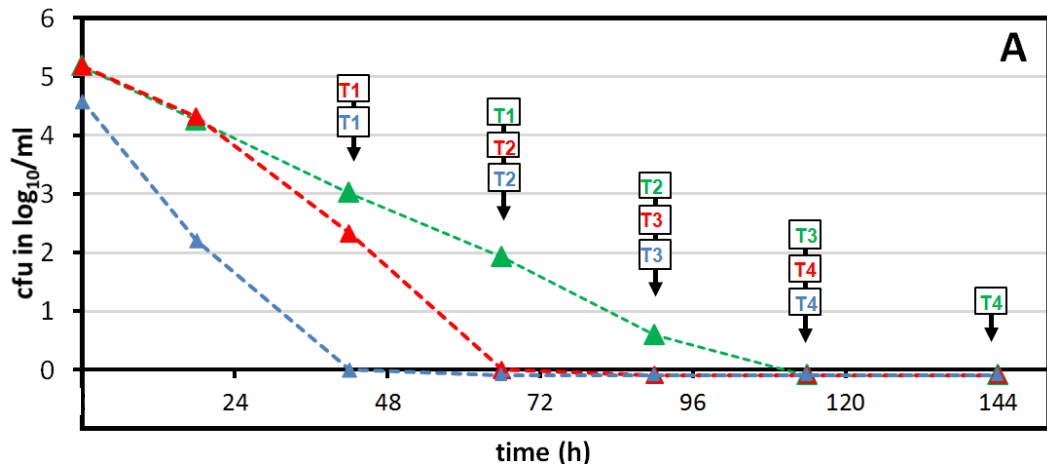
C. jejuni DSM 4688

—▲— cfu —●— qPCR (PMA)

C. coli DSM 4689

—▲— cfu —●— qPCR (PMA)

Das Überleben von *Campylobacter* in Rohmilch scheint unterschätzt



- Variation der Inkubationsbedingungen auf mCCDA
→ beste Bedingung: 37 °C, 1 % O₂, 10 % CO₂, 3,5 % H₂
- *C. jejuni* and *C. coli* scheinen in Rohmilch Wachstum aktiv abzuschalten und dies bei Anwesenheit eines sehr geringen Sauerstoffpartialdruckes (3,5 % H₂ und 1% O₂) wiederaufzunehmen

→ die Werte der lebend qPCR sind relevant!

Temperatur-Reduktion a: 42 °C; b – e : 37 °C
 Reduktion oxidativer Stress: a+b: 5 % O₂; c+d: 1 % O₂; d+e: + 3,5 % H₂

Fazit und Ausblick

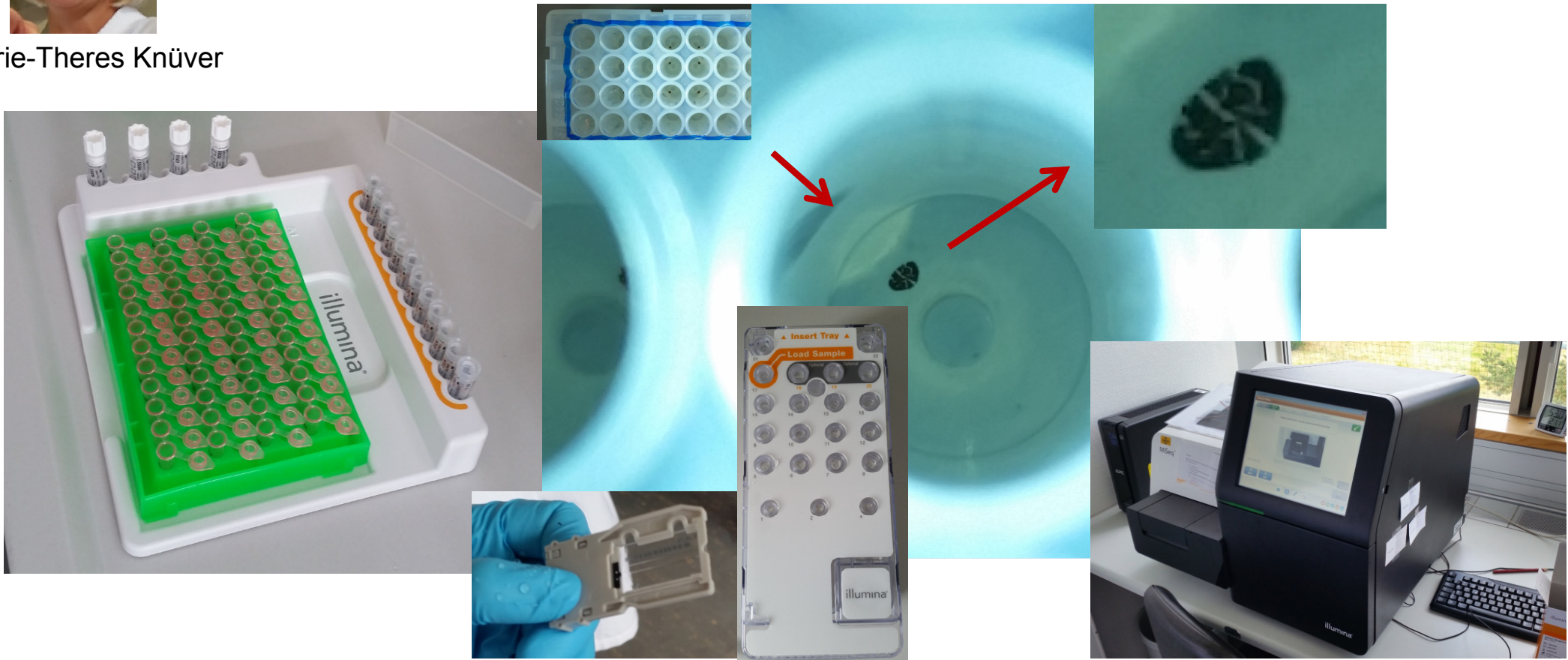
- Diskussion mit den Länderlaboratorien auf dem nächsten NRL-Symposium (Juni 2019)
- Umsteigen auf Milchfilter statt Rohmilchproben bei ZoMo-Nat (höhere Anreicherung der Bakterien)
- Nutzung einer veränderten Atmosphäre für die Anzucht
→ ggf. bei einer zukünftigen LVU mit Rohmilch einführen und parallel testen
- Abwarten der Ergebnisse aus dem Ringversuch CAMPY-TRACE Ende 2019 und Erwägung eines Ringversuches zur Validierung der lebend qPCR für Rohmilchproben (ca. 30-fach geringere Sensitivität als Anreicherung)



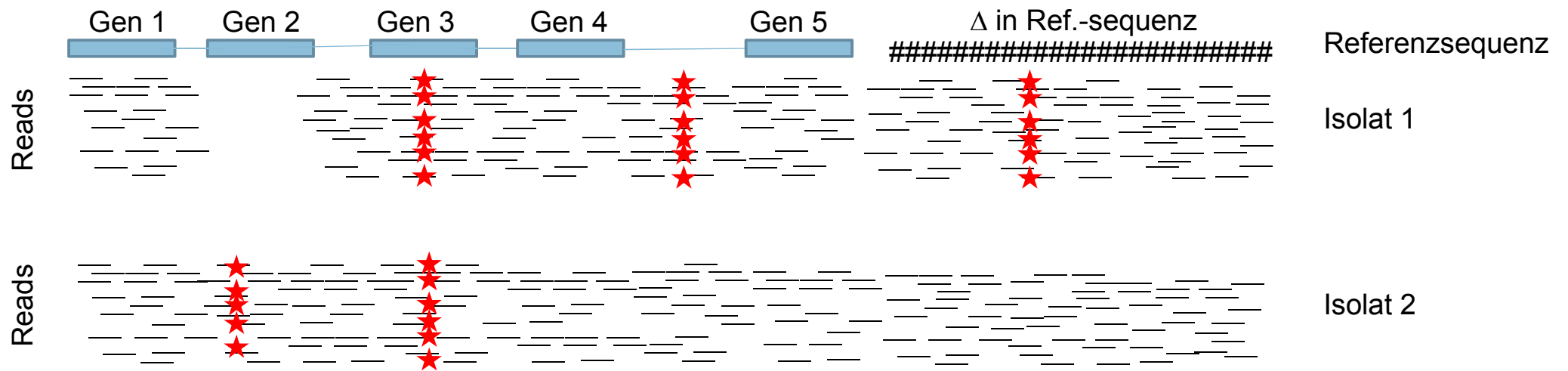
Ganzgenomsequenzierung von *Campylobacter*

Illumina MiSeq (in Kooperation mit 4 SZ, Burkhard Malorny und Team)

Marie-Theres Knüver



Genbasierter Allelvergleich versus SNP-Analyse gegenüber welcher Referenz?



Prinzipielle Schlussfolgerungen:

- Isolat 1 fehlt das Gen 2 oder Sequenzierungslücke; evtl. Allelunterschied in Gen 2 kann nicht beurteilt werden
- Vergleich aufgrund vorhandener gemeinsamer Gene möglich („pairwise ignore missing values“)
- SNP-Analyse erweitert Vergleich auch auf intergenische Regionen
- Vergleich mit möglichst nah verwandter Referenzsequenz maximiert Auflösung

Ganzgenomsequenzierung von *C. jejuni* Isolaten im Ausbruchsgeschehen

- Austausch der Stämme mit dem Robert-Koch Institut, Wernigerode (Frau Fruth, Frau Banerji)
- Extraktion genomischer DNA, Qualitätskontrolle, Library Präparation
- MiSeq/NextSeq (Illumina) Sequenzierung
- QM-Analyse mittels der BfR Pipeline (C. Deneke und S. Tausch) und mittels kommerzieller Ridom Seqsphere+ Software

- Referenzstämme aus NCBI erneut sequenziert
- Austausch Stämme mit LGL (parallele Sequenzierung)
- PacBio und MiSeq Datensätze und verschiedene Library Kitsysteme
- mehrfach Sequenzierung desselben Stammes

Summary table

The table is searchable and sortable. At the end, clickable links are provided to the created fasta file, to the best ncbi reference contig and to the quast and icarus reports.

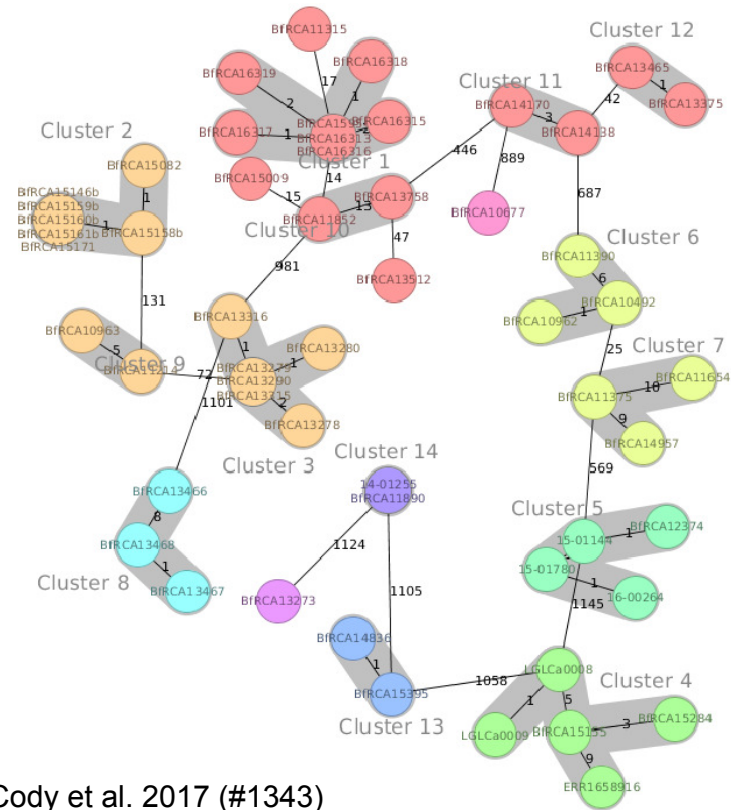
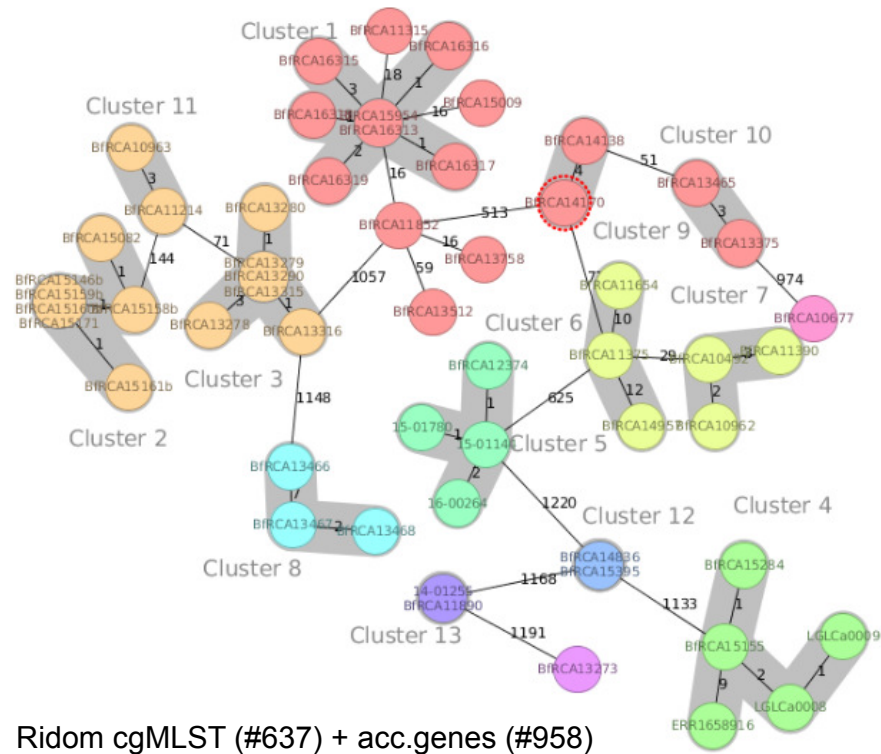
Note that the best reference is selected from the set of all complete bacterial chromosome assemblies. Hence plasmids are excluded which in turn might reflect in a larger genome length of the sample than the reference. Furthermore, for 1 chromosome, only the best matching chromosome is reported. Thus gene count, reference length etc. are properties of the best matching chromosome.

Show entries

Search:

sample name	reference	# reads	Megabases	assembly coverage	raw coverage	# contigs	N50	# genes	# partial genes	fraction genes recovered	genome coverage	total length	reference length
BIRCA08235	Campylobacter jejuni subsp. jejuni strain FDAARGOS_265 chromosome, complete genome	1370392	199.0	118.7	120.7	33	116254	1579	33	0.97	95.0	1655217	1649384
BIRCA08247	Campylobacter coli strain MG1116, complete genome	689978	101.4	59.2	60.9	51	141495	1570	30	0.95	94.8	1686368	1665146
BIRCA10987	Campylobacter coli strain YH501, complete genome	1134840	164.7	95.2	98.7	35	162760	1542	28	0.96	94.8	1708881	1668523

Allel-basierter Vergleich von *Campylobacter* auf Grundlage zweier Schemata



Task Templates: C. jejuni/coli cgMLST 637 v1.3, C. jejuni MLST, C. jejuni/coli Accessory 958 v1.2
 Comparison Table Retrieval: CampyDB5 [unstored]
 Comparison Table created: Mar 22, 2019 2:15 PM (v5.1.0_(2018-06))
 C. jejuni/coli cgMLST 637 Cluster-Alert distance: 13
 Ridom SeqSphere+ MST for 55 Samples based on 1602 columns, pairwise ignoring missing values, logarithmic scale
 Distance based on columns from C. jejuni/coli cgMLST 637 (637), C. jejuni/coli Accessory 958 (958), C. jejuni MLST (7)
 Color grouped by column "ST":

Task Templates: Cj-Cc_PubMLST.org cgMLST v1.0, C. jejuni MLST
 Comparison Table Retrieval: CampyDB5 [unstored]
 Comparison Table created: Mar 22, 2019 12:59 PM (v5.1.0_(2018-06))
 Ridom SeqSphere+ MST for 55 Samples based on 1350 columns, pairwise ignoring missing values, logarithmic scale
 Distance based on columns from Cj-Cc_PubMLST.org cgMLST v1.0 (1343), C. jejuni MLST (7)
 Color grouped by column "ST":

Allel-basierte Analyse und Vorscreening plus SNP Analyse für höhere Auflösung

- zunächst Allel-basierte Analyse mittels Ridom
- höhere Auflösung durch erweiterte SNP-Analyse
- hier möglichst eine nahe verwandte Sequenz (Concatemer einer assemblierten Sequenz des „Ausbruchsgeschehens“)

Stamm-Nr.	Matrix	ST	CC	<i>flaA</i>	<i>porA</i>	# diff. Allel		# diff. SNP	Ref-Seq.
						Ridom Schema	Cody Schema	40 cov./ 0.8 freq	
BfR-CA-13290	Rohmilch	13	61	1017	36	0	0	0	BfR-CA-13290
BfR-CA-13280	Stuhl	13	61	1017	36	1	1	0	BfR-CA-13290
BfR-CA-13279	Stuhl	13	61	1017	36	0	0	3	BfR-CA-13290
BfR-CA-13278	Stuhl	13	61	1017	36	3	2	4	BfR-CA-13290
BfR-CA-13315	Rohmilch	13	61	1017	36	0	0	0	BfR-CA-13290
BfR-CA-13316	Rohmilch	13	61	44 (5' 493 bp in <i>flaA</i> identisch mit BfR-CA-13315)	36	1	1	12	BfR-CA-13290
BfR-CA-13273	Rohmilch	14	257	16	1	1267	1214	19434	BfR-CA-13290

Vergleichende Auswertung mittels cgMLST und SNP-Analyse

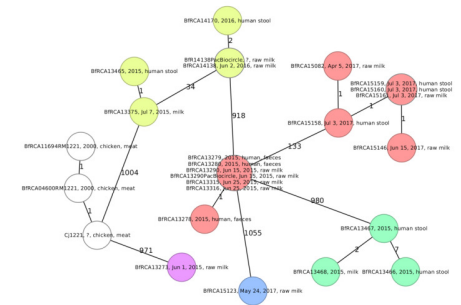
Stamm-Nr.	Matrix	ST	CC	<i>flaA</i>	<i>porA</i>	# diff. Allel		# diff. SNP 40 cov./ 0.8	Ref-Seq.
						Ridom	Cody		
BfR-CA-13375	Rohmilch	21	21	245	48	0	0	3	BfR-CA-13375
BfR-CA-13465	Stuhl	21	21	245	48	3	1	5	BfR-CA-13375
BfR-CA-14138	Rohmilch	21	21	245	48	52	43	532	BfR-CA-13375
BfR-CA-14170	Stuhl	21	21	245	48	53	44	496	BfR-CA-13375
BfR-CA-13375	na	na	na	na	na	52	43	536	BfR-CA-14138
BfR-CA-13465	na	na	na	na	na	51	42	439	BfR-CA-14138
BfR-CA-14138	na	na	na	na	na	0	0	0	BfR-CA-14138
BfR-CA-14170	na	na	na	na	na	4	3	3	BfR-CA-14138

→ zwei Ausbruchsgeschehen getrennt durch 1 Jahr und 1 Stunde Autofahrt

→ durch Allel-basierte und SNP-Analyse klar trennbar

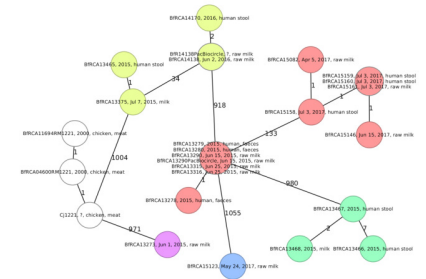
Fazit und Ausblick 1/2

- Harmonisierung mit RKI, AGES, LGL ist noch nicht abgeschlossen...
 - weitere Datensätze sollen noch ausgewertet/ausgetauscht werden
 - Einigung auf einen Workflow oder mehreren Möglichkeiten mit ähnlichem Ergebnis
 - Validierung der Datenauswertung mit dem „benchmark dataset for phylogenomic pipeline validation“ Timme et al. 2017 PeerJ
- QM-Kontrollen festlegen (in Abstimmung mit 4 SZ, Ergebnisse werden in die §64 AG eingebracht)
- Teilnahme des NRLs an Laborvergleichsuntersuchungen (EU-RL, PT25 derzeitig laufend)



Fazit und Ausblick 2/2

- Es wird keine absolute Zahl an Sequenzunterschieden für die eindeutige Identifizierung eines Clusters geben.
 - 1) es wird immer Sequenzlücken geben oder Bereiche mit QM-Defiziten, die nicht in die Analyse eingehen
 - 2) die molekulare Uhr ist abhängig vom Bakterium, von der Umgebung (Stress, freie DNA, etc.), ist für jedes Gen/jede intergenische Region unterschiedlich (konserviert vs. variabel; (konditional) essentiell vs. (konditional) nebensächlich)
- **Der molekulare Befund kann nur die epidemiologischen Evidenzen unterstützen, fungiert aber nie alleine als Beweis für einen Ausbruchszusammenhang !!!**
- Die WGS ist eine sehr effiziente und hochauflösende Methode, die alle bisherigen Methoden der Typisierung übertrifft und Labor-übergreifend international genutzt werden kann.



DANKE an....

...die Untersuchungsämter der Länder

NRL for *Campylobacter*

Christiane Buhler

Julia Golz

Marie-Theres Knüver

Dr. Britta Kraushaar

Maja Thieck

Petra Vogt

Imke F. Wulsten

**Danke für Ihre
Aufmerksamkeit !**

PD Dr. Burkhard Malorny und Team (BfR, 4 SZ)

Prof. Annemarie Käsbohrer und Team (BfR, Zoonosen Monitoring)

Dr. Stefanie Bannecke, Heide-Marie Lochotzke (BfR, 95)

Dr. Sandra Köberl-Jelovcan (AGES, Graz, Österreich)

Dr. Ingrid Huber, Larissa Murr (LGL, Oberschleißheim)

Dr. Angelika Fruth, Dr. Sangeeta Banerji (RKI, NRZ)

