

Liebe Kolleginnen,
liebe Kollegen,

wir freuen uns sehr, Sie im Namen der Nationalen Forschungsplattform für Zoonosen zum ersten interdisziplinären Fachworkshop mit dem Titel „Campylobacter, Arcobacter & Related Organisms“ (CARO) begrüßen zu können.

Die Veranstaltung wird erstmals hier in Berlin von Arbeitsgruppen der Charité, dem Bundesinstitut für Risikobewertung und der Freien Universität durchgeführt. Der Schwerpunkt liegt auf Themen, die mit der Campylobacter-Infektion assoziiert sind. Es ist unser Ziel, die interdisziplinär tätigen Verantwortlichen, die mit dieser infektionsbiologisch hochaktuellen Problematik befasst sind, zusammenzuführen. Durch Ihre durchweg positiven Rückmeldungen und aktiven Beiträge zur Organisation war es möglich, ein Vortragsprogramm aus den Bereichen Tierhygiene, Veterinärmedizin, Humanmedizin, Primärproduktion und Überwachung von Lebensmitteln, Risikobewertung, Epidemiologie und Forschung zusammenzustellen.

Wir hoffen darauf, dass die auf der Tagung gemeinsam erarbeiteten Initiativen zur Lösung der sozioökonomischen Probleme beitragen, die durch Krankheitserreger der Gattung Campylobacter verursacht werden. Mit der Gründung von Förderkonsortien und neuen Plattformen für die Öffentlichkeitsarbeit möchten wir in der Gesellschaft mehr Bewusstsein schaffen und Maßnahmen erarbeiten, die geeignet sind, mit Campylobacter kontaminierte Lebensmittel sicherer zu machen. Diese Aktivitäten sollen nachhaltig zu einer Verbesserung der epidemiologischen Situation beitragen. Die Nationale Forschungsplattform für Zoonosen hat die Relevanz dieses Themas unterstrichen. Weiterhin wird die Veranstaltung durch die Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft und die Fachgruppe „Zoonosen“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie gefördert.

Unser besonderer Dank gilt den Vortragenden, allen Teilnehmerinnen und Teilnehmern sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die vor Ort dazu beitragen, die

gemeinsamen Interessen zu bündeln. Wir wünschen uns eine anregende Tagung mit einem lebhaften Austausch – unter Kolleginnen, Kollegen und Freunden.

Dazu heißen wir Sie in Berlin recht herzlich willkommen!

Ihr Organisationskomitee für CARO2014

Univ.-Prof. Thomas Alter, Prof. Stefan Bereswill, Dr. Greta Gölz, Dr. Markus M. Heimesaat, Dr. Kerstin Stingl, Univ.-Prof. Lothar H. Wieler

ALLGEMEINE INFORMATIONEN



Ort und Zeit

Freie Universität Berlin
Fachbereich Veterinärmedizin
Campus Döppel
Weiterbildungszentrum "Veterinarium Progressum" (Haus 9)
Oertzenweg 19b
14163 Berlin

20. - 21. November 2014

Veranstalter

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Prof. Stefan Bereswill | Dr. Markus M. Heimesaat
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin

FU Berlin

Prof. Thomas Alter | Dr. Greta Gölz
Institut für Lebensmittelhygiene
Königsweg 69, 14163 Berlin

Prof. Lothar Wieler
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Dr. Kerstin Stingl
NRL Campylobacter
Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Co-Veranstalter

FBI-Zoo
DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“
DGHM-Fachgruppe „Zoonosen“

Kontakt

Organisatorische Rückfragen

Frau Dr. Greta Gölz

Telefon: 030-838-62539
Telefax: 030-838-4-62539
E-Mail: greta-goelz@fu-berlin.de

Fachliche Rückfragen

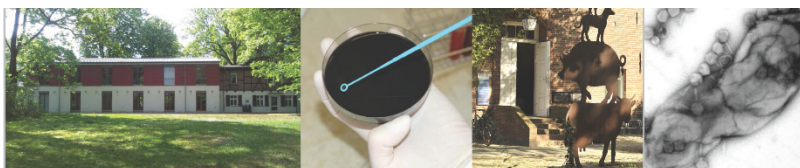
Prof. Dr. Stefan Bereswill

stefan.bereswill@charite.de

Prof. Dr. Thomas Alter

Thomas.alter@fu-berlin.de





Donnerstag, 20. November 2014

- ab 11.00 Uhr **Registrierung und Imbiss**
- 12.00 Uhr **Begrüßung**
- 12.15 Uhr **Keynote**
Aktuelle Fragestellungen zur Erforschung und Bekämpfung der Campylobacteriose
Trudy Wassenaar (MMGC)
- Epidemiologie**
- 13.00 Uhr Surveillance und Epidemiologie von Campylobacter in Deutschland | **Klaus Stark (RKI)**
- 13.20 Uhr Campylobacter in Österreich-aktueller Stand
Sandra Jelovcan (AGES)
- 13.35 Uhr Wirts-Bakterium-Interaktion, Koevolution und Epidemiologie von Campylobacter im Wirtsorganismus | **Christine Josenhans (MHH)**
- Kolonisation/Pathogenese/Infektion I**
- 13.55 Uhr Einführung | **Steffen Backert (Universität Erlangen)**
- 14.05 Uhr Mechanistische Grundlagen der Campylobacter-Enteritis
Roland Bücker (Charité)
- 14.25 Uhr Wie überwindet C. jejuni die intestinale Barriere?
Steffen Backert (Universität Erlangen)
- 14.45 Uhr Globale Transkriptomanalyse und regulatorische RNA in C. jejuni | **Cynthia Sharma (Universität Würzburg)**
- 15.05 Uhr Kommuniziert Campylobacter über AI-2?
Linda Adler (FU Berlin)
- 15.25 Uhr **Kaffeepause**
- Kolonisation/Pathogenese/Infektion II**
- 16.00 Uhr Einfluss des Wirtsmetabolismus und der Mikrobiota auf das Kolonisierungsverhalten von Campylobacter
Dirk Hofreuter (MHH)
- 16.20 Uhr Suszeptibilität von Campylobacter gegenüber intestinalen antimikrobiellen Peptiden und Proteinen
Roman Gerlach (RKI)

- 16.40 Uhr Funktionen lymphoider Zellen in der Abwehr intestinaler Pathogene | **Andreas Diefenbach (Universität Mainz)**
- 17.00 Uhr Interaktion von Campylobacter mit dem Immunsystem des Huhns | **Bernd Kaspers (LMU)**
- 17.20 Uhr Freund oder Feind? Zur Rolle von mikrobiellen Molekülen bei intestinaler Entzündung und Homöostase
Julia-Stefanie Frick (Universität Tübingen)
- 17.40 Uhr Veränderung der Darmflora des Geflügels durch Besiedelung mit Campylobacter jejuni | **Friederike Hilbert (VU Wien)**

ab 20.00 Uhr Abendveranstaltung

Freitag, 21. November 2014

- 9.00 Uhr **Keynote**
Perspektiven des Next-generation sequencing für die klinische Mikrobiologie | **Lothar H. Wieler/Torsten Semmler (FU Berlin)**
- 9.40 Uhr **Kaffeepause**
- Diagnostik**
- 10.10 Uhr Einführung | **Kerstin Stingl (BfR)**
- 10.20 Uhr Kultureller Nachweis thermophiler Campylobacter spp. in Lebensmitteln – Möglichkeiten und Grenzen der Routinediagnostik | **Ute Messelhäuser (LGL)**
- 10.40 Uhr Standardisierung von PCR-Systemen zur Detektion von Campylobacter | **Ingrid Huber (LGL)**
- 11.00 Uhr Kultivierungs-unabhängige Quantifizierung lebender Campylobacter – „how dead is dead?“
Kerstin Stingl (BfR)
- 11.20 Uhr Campylobacter jejuni – Diagnostik (Proteomik)
Andreas Zautner/Raimond Lugert (Universität Göttingen)
- 11.40 Uhr Campylobacter jejuni – Diagnostik (Serodiagnostik)
Andreas Zautner/Raimond Lugert (Universität Göttingen)
- 12.00 Uhr **Mittagspause**

- Minimierungsstrategien bzw. Bekämpfungsmöglichkeiten**
- 13.00 Uhr Aktuelle Ansätze zur Minimierung von Campylobacter in der Lebensmittelkette | **Günter Klein (TiHo Hannover)**
- 13.20 Uhr Trends in Campylobacter and E. coli contamination on broiler chicken carcasses during slaughtering
Ewa Pacholewicz (Universität Utrecht, NL)
- 13.40 Uhr Charakterisierung von virulenten Campylobacter-Phagen und deren Einsatzmöglichkeiten
Stefan Hertwig und Jens Hammer (BfR)
- 14.00 Uhr Shigatoxine von Escherichia coli: bakterielle Glykolipid-Rezeptor-Agonisten mit modulatorischer Wirkung | **Christian Menge (FLI Jena)**
- 14.20 Uhr **Kaffeepause**
- Arcobacter und Campylobacter fetus**
- 14.50 Uhr Einführung | **Greta Gözl (FU Berlin)**
- 15.00 Uhr Adhäsive und invasive Eigenschaften von Arcobacter butzleri – in vitro Studien | **Greta Gözl (FU Berlin)**
- 15.15 Uhr Das pathogene Potential von Arcobacter in der Maus
Markus Heimesaat/Stefan Bereswill (Charité)
- 15.35 Uhr Wirkungen von Arcobacter auf intestinale Barrierefunktionen | **Roland Bücker (Charité)**
- 15.55 Uhr Molekulare Virulenzforschung am humanen und veterinärmedizinisch bedeutenden Pathogen Campylobacter fetus | **Gregor Gorkiewicz (Medizinische Universität Graz)**
- 16.15 Uhr Zusammenfassung und Ausblick
Stefan Bereswill (Charité)
- 16.30 Uhr Diskussion über gemeinsame Forschungsaktivitäten
- 17.00 Uhr **Verabschiedung**

ABSTRACTS

Epidemiologie

Surveillance und Epidemiologie von *Campylobacter* in Deutschland

Klaus Stark, Bettina Rosner, Janina Breidenbach, Anika Schielke

Fachgebiet Gastrointestinale Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen, Abt. für Infektionsepidemiologie, Robert Koch-Institut, Seestr. 10, 13353 Berlin

Hintergrund

Durch *Campylobacter* spp. bedingte Erkrankungen sind im Rahmen der nationalen Surveillance die häufigsten meldepflichtigen bakteriellen gastrointestinalen Erkrankungen in Deutschland. Im Unterschied zu anderen gastrointestinalen Infektionskrankheiten, z.B. Salmonellosen, bewegte sich die Anzahl der jährlich gemeldeten Campylobacteriose-Fälle in den letzten Jahren auf hohem Niveau.

Methoden

Die nationalen Surveillance-Daten zu *Campylobacter*-Infektionen wurden systematisch ausgewertet, die Daten von 2001 bis 2010 in einer vertieften Analyse. Ein spezieller Fokus war auf die geographische Verteilung, die Zeittrends und die hauptsächlich betroffenen Bevölkerungsgruppen gerichtet.

In einer bevölkerungsbezogenen Fall-Kontroll-Studie in Berlin, Brandenburg, NRW und Sachsen von Anfang 2012 bis Februar 2014 wurden insgesamt 2.100 Campylobacteriose-Fälle und 4.100 gesunde Kontrollpersonen zu klinischen Symptomen, soziodemographischen Charakteristika und Risikofaktoren (Verzehrsgewohnheiten etc.) standardisiert befragt.

Diese epidemiologischen Informationen können bei einem Teil der Fälle mit molekularen Typisierungsdaten der Humanisolate verknüpft werden (Kooperation mit der Med. Hochschule Hannover, Institut für Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene).

Ergebnisse

Von 2001 bis 2007 stieg die Zahl der jährlich gemeldeten Campylobacteriose-Fälle deutlich an und lag seither zwischen 63.000 und 66.000. In 2011 (Jahr des EHEC O104-Ausbruchs) war mit 71.000 Fällen das bisherige Maximum zu verzeichnen. Im Jahr 2013 wurden 63.646 Fälle gemeldet (Inzidenz von 78 pro 100.000 Einwohner). Die Inzidenz zeigte jahreszeitliche Schwankungen mit einem ausgeprägten Gipfel in den Sommermonaten und einem kleineren Gipfel im Januar. Die höchsten Inzidenzen wurden bei Kindern ≤ 4 Jahren und bei jungen

ABSTRACTS

Erwachsenen (20-29 Jahre) beobachtet. Basierend auf den Meldedaten haben insbesondere jüngere Kinder in ländlichen Regionen ein erhöhtes Risiko einer *Campylobacter*-Infektion. Von den Erkrankungsfällen mit Information zur *Campylobacter*-Spezies waren 90% von *C. jejuni*, 7% von *C. coli* und 2% von anderen Spezies (*C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*) verursacht. Etwa 93% der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen wurden in Deutschland erworben. Nur 2% der Erkrankungen traten im Zusammenhang mit Ausbrüchen auf. Die größeren Ausbrüche waren zumeist auf den Konsum von Rohmilch zurückzuführen. Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studie werden im Vortrag präsentiert werden.

Diskussion

Campylobacteriosen stellen in Deutschland weiterhin ein großes Problem dar. Die Inzidenzen waren in den letzten Jahren unverändert hoch und machen verstärkte Maßnahmen im Bereich Öffentliche Gesundheit und Lebensmittelsicherheit erforderlich. Auf der Basis der Surveillance-Daten können besonders gefährdete Bevölkerungsgruppen identifiziert werden. Epidemiologische Studien, auch in Kombination mit molekularbiologischen Untersuchungen, tragen dazu bei die spezifischen Risikofaktoren und Infektionsquellen aufzudecken und zu quantifizieren.

***Campylobacter* in Österreich – aktueller Stand**

S. Jelovcan¹, M. Matt², und B. Springer¹

¹AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Graz, Zentrum für lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten, Graz, Österreich

²AGES Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Fachbereich Integrative Risikobewertung, Daten und Statistik, Innsbruck, Österreich

Campylobacter ist weltweit einer der häufigsten Ursachen für akute bakterielle Gastroenteritis beim Menschen. Seit 1996 ist die *Campylobacteriose* in Österreich eine meldepflichtige Krankheit und liegt seit 2007 bundesländerweit an erster Stelle der gemeldeten lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten. Durchschnittlich werden in Österreich rund 5.200 Fälle von *Campylobacteriose* pro Jahr gemeldet, im Jahr 2013 lag die Inzidenz bei 67,7/100.000 Einwohner. Ca. 100 *Campylobacter*-Ausbrüche mit durchschnittlich 2,3 betroffenen Personen werden pro Jahr registriert, Rohmilch und Geflügelfleisch stellen die bekannten relevanten Lebensmittelvehikel da. Regelmäßige Lebensmittel-Überwachungsaktionen im Einzelhandel belegen die geringe Relevanz von Lebensmitteln aus Schwein und Rind für eine *Campylobacter*-Infektion, wohingegen Hühnerfleisch eine Kontaminationsrate von 47,5 bis 77,8% aufweist. Das seit 2004 durchgeführte Monitoring von Nutztierpopulationen in Österreich weist eine Prävalenz von *Campylobacter* in Hühnerherden zwischen 50 und 60% aus. Hinsichtlich Antibiotikaresistenz verzeichnet Österreich nach wie vor eine seit Jahren niedrige Resistenz gegenüber Makroliden, wohingegen sich die Fluorochinolonresistenzrate innerhalb der letzten Jahre auf sehr hohem Niveau bei durchschnittlich 58% in humanen *C. jejuni*- und 68% in *C. coli*-Isolaten stabilisiert hat. Derzeitige Bemühungen sind darauf ausgerichtet, genauere Untersuchungen zu *Campylobacter* in den für eine Infektion beim Menschen bedeutsamen Reservoirs durchzuführen und mögliche Interventionen entlang der Lebensmittelkette zu evaluieren.

Wirts-Bakterium-Interaktion, Koevolution und Epidemiologie von *Campylobacter* im Wirtsorganismus

Christine Josenhans

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover

Intestinale *Campylobacter* spp. kolonisieren verschiedene Tierspezies chronisch, rufen jedoch im Menschen meist akute, stark entzündliche und selbstlimitierende intestinale Erkrankungen hervor. Die genetische Vielfalt dieser Organismen und ihre genetische Flexibilität macht es schwierig, Infektionsketten zu identifizieren, besondere Risikofaktoren für eine Infektion des Menschen zu finden und zu minimieren, sowie spezifische kolonisierungs- oder erkrankungsfördernde Faktoren der Bakterien in verschiedenen Wirtsorganismen zuzuordnen und zu definieren. Mit dem zunehmenden Einsatz molekularer Typisierungsmethoden und der Gesamtgenomsequenzierung ist es gelungen, die molekulare Vielfalt intestinaler *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli*) umfassender zu charakterisieren und phylogenetische Linien der Bakterien zu identifizieren (Generalisten), die in Deutschland und weltweit mit größerer Wahrscheinlichkeit Mensch und Tier infizieren (Gripp et al., 2011). Neueste Erkenntnisse aus molekularer Typisierung und Gesamtgenomsequenzierung zur Epidemiologie, Wirtszuordnung und genetischer Flexibilität/Evolution intestinaler *Campylobacter* spp. in Deutschland werden präsentiert werden.

Mikroorganismen wie *Campylobacter* spp. die den Intestinaltrakt kolonisieren, besitzen Eigenschaften, die sie befähigen, dieses besondere Habitat kurzzeitig oder langfristig zu besiedeln. Sie müssen in Konkurrenz mit der hohen Dichte der residenten Mikrobiota überleben und finden eine immunologische Umgebung vor, die durch die Mikrobiota schon auf Abwehr eingestellt ist. Bisher ist wenig darüber bekannt, wie *Campylobacter* ssp. mit dem angeborenen Immunsystem ihrer Wirte interagieren, z.B. über die Mustererkennungsrezeptoren (PRR) des Wirtsorganismus wie z.B. den Toll-like (TLR) und den NOD-like (NLR) Rezeptoren. Es ist schon bekannt, dass *C. jejuni* in seinen Fähigkeiten, die angeborene Immunabwehr über TLR5 und TLR4 zu aktivieren, eingeschränkt ist, was zur chronischen Etablierung in verschiedenen Tierspezies beitragen könnte.

Wir haben nun zusätzlich zu den klassischen Flagellinproteinen, die das Bewegungsorganell der Bakterien bilden und gleichzeitig Liganden von TLR5 sein können, in *Campylobacter* spp. das ungewöhnliche flagellinartige Protein FlaC charakterisiert. FlaC wird hauptsächlich nach

ABSTRACTS

außen abgegeben und ist nicht an der Beweglichkeit der Bakterien beteiligt (Song et al., 2004). Aufgrund seiner flagellinähnlichen Eigenschaften haben wir uns mit der Hypothese beschäftigt, FlaC könnte an der Modulation von Wirtsimmunantworten in verschiedenen Wirtsorganismen beteiligt sein. Wir haben daher intensiv die Interaktion des Proteins, sowohl in gereinigter Form als auch im Kontext der lebenden Bakterien, mit verschiedenen Wirtsspezies, z.B. Mensch und Huhn, experimentell untersucht. Diese spezifischen Ergebnisse zur Wirtsinteraktion und Wirtsimmunmodulation werden vorgestellt und diskutiert.

Gripp, E. et al., 2011, BMC Genomics Nov 28,12:584.

Song, Y.C. et al., 2004. Mol Microbiol 53(2): 541-53.

Kolonisation
Pathogenese
Infektion I

Mechanistische Grundlagen der *Campylobacter*-Enteritis

Roland Buecker¹, Susanne M. Krug¹, Verena Moos², Thomas Schneider², Christian Bojarski², Jörg-Dieter Schulzke^{1*} & Christian Barmeyer^{1,2}

¹Institut für Klinische Physiologie

²Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin.
roland.buecker@charite.de

*Diese Studie wird unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schu 559/11).

Hintergrund

Die *Campylobacter jejuni*-Infektion verursacht Diarrhö und Entzündung. Die Campylobacteriose ist die häufigste Zoonose und die häufigste bakterielle Gastroenteritis, dennoch ist ihre Pathogenese bisher in vielen Details noch nicht vollständig verstanden.

Fragestellung

Das Ziel der Studie war die Charakterisierung der Barriere- und Transporteigenschaften des Darmepithels von *C. jejuni*-infizierten Patienten. Biopsien von Patienten wurden während Routine-Endoskopien aus dem Colon sigmoideum entnommen. An den Kolonproben wurden in miniaturisierten Ussing-Kammern elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt.

Ergebnisse

Die Kolonmucosa von *C. jejuni*-infizierten Patienten zeigte eine Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion in Form einer Erniedrigung des transepithelialen elektrischen Widerstands. Zugleich war die parazelluläre Permeabilität für Fluoreszein (332 Da) heraufgesetzt. In Western-Blot-Analysen zeigte sich eine Expressionsänderung von Tight Junction-Proteinen. Abdichtende Claudine waren herunterreguliert und intrazellulär umverteilt, was sich in der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie zeigte. Des Weiteren fanden wir eine Hemmung des epithelialen Na⁺-Kanals ENaC mit einer Reduktion des Amilorid-sensitiven elektrogeneren Natriumtransports von $11 \pm 3 \mu\text{mol/h}\cdot\text{cm}^2$ im gesunden Kontrollgewebe auf $1 \pm 1 \mu\text{mol/h}\cdot\text{cm}^2$ bei *Campylobacter*-infizierten Proben ($P < 0.05$, $n=3$).

Diskussion

Die pathologischen Veränderungen im Kolon bei der *Campylobacter*-induzierten Diarrhö sind charakterisiert durch eine epitheliale Barrierestörung mit Fehlregulation der Tight Junction, die in einem lecken Epithel resultiert, sowie durch eine Natrium-Malabsorption in Folge einer Störung des epithelialen Na⁺-Kanals ENaC. Die pathogenetischen Mechanismen der Diarrhö durch *Campylobacter jejuni* sind somit zurückzuführen auf eine Kombination bestehend aus einer malabsorptiven Komponente und einer Leckflux-Komponente, die auf der parazellulären Undichtigkeit des Darmepithels basiert.

Paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells: role of the secreted serine protease HtrA

Steffen Backert

Friedrich Alexander University Erlangen, Dept. of Biology, Division of Microbiology, Staudtstr. 5, D-91058 Erlangen, Germany

Background and research question

Campylobacter jejuni is one of the most important bacterial pathogens of foodborne illness. Crossing the intestinal epithelial barrier and host cell invasion are primary reasons for tissue damage triggered by *C. jejuni*, but molecular mechanisms are widely unknown. We have recently shown that the serine protease HtrA (High temperature resistant protein A) of *C. jejuni* is secreted into the extracellular space, where it can cleave the ectodomain of the host cell adhesion protein and tumour suppressor E-cadherin. Aim of the present study was therefore to study in detail the transmigration process of *C. jejuni* and rigorous mutagenesis of HtrA.

Methods

Tight monolayers of polarized MKN-28 and MDCK epithelial cells in a transwell filter system were confirmed by fluorescence microscopy and measuring the transepithelial resistance (TER). We developed a genetic complementation system for studying *htrA* in *C. jejuni*. This allowed us to complement the wild-type *htrA* gene in trans, to exclude polar effects and to generate deletion and point mutants of *htrA* across the gene. Transmigration of wild-type *C. jejuni* and *htrA* mutants across MKN-28 and MDCK cells was studied by confocal laser scanning microscopy (CSLM), scanning electron microscopy (SEM) and TER determination.

Results

We confirmed that our $\Delta htrA$ mutant is non-polar because complementation with the wild-type gene restored (i) expression of proteolytically active HtrA multimers, (ii) *C. jejuni* growth at high temperature (44°C) and (iii) growth under high oxygen stress conditions. Wild-type *C. jejuni* and complemented strains transmigrated efficiently in a time course up to 24 hours, while various *htrA* point and deletion mutants cannot. CSLM and SEM studies showed that the bacteria first adhere at the apical surface near the cell-to-cell junctions and then transmigrate by a paracellular pathway between neighboring cells, while leaving TER values unchanged.

ABSTRACTS

The extracellular domain of E-cadherin is cleaved-off by HtrA *in vitro* and during infection *in vivo*. The cleavage sites have been identified by N-terminal sequencing. In addition, we identified peptide inhibitors for E-cadherin processing by recombinant HtrA. One such peptide was also able to efficiently block E-cadherin ectodomain shedding and *C. jejuni* transmigration during infection.

Discussion

In the present study we identified and characterized the serine protease HtrA of *C. jejuni* as a novel secreted virulence factor which opens the cell-to-cell junctions by cleaving the host cell adhesion protein and tumour suppressor E-cadherin. HtrA-mediated E-cadherin cleavage is involved in rapid crossing of the epithelial barrier by *C. jejuni* via the paracellular route to reach basolateral surfaces. The results of this study advocate HtrA as a promising novel anti-infective drug target.

Globale Transkriptomanalyse und regulatorische RNA in *C. jejuni*

Dugar G.¹, Svensson S. L.¹, Bischler T.¹, Herbig A.², Förstner K.^{1,3}, Reinhardt R.⁴, Nieselt K.², Sharma C.M.¹

¹Universität Würzburg, Zentrum für Infektionsforschung (ZINF), Josef-Schneider-Str. 2/ Bau D15,

97080 Würzburg

²Universität Tübingen, Integrative Transkriptomik, ZBIT, Tübingen

³Universität Würzburg, Institut für Molekulare Infektionsbiologie (IMIB), Würzburg

⁴Max-Planck-Genom-Center Köln, Köln

Eine zentrale Kontrollebene von verschiedenen physiologischen Prozessen in der Zelle spielt die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression. Neben kleinen regulatorischen RNAs (sRNAs) spielen hierbei vor allem RNA-Bindeproteine eine wichtige Rolle, welche in Bakterien zusammen mit sRNAs als zentrale Regulatoren während der Anpassung an Stressbedingungen oder während der Pathogenität wirken. Obwohl genomweite Studien Hunderte von sRNAs in diversen Bakterien identifiziert haben, basieren die meisten bekannten Funktionen und Mechanismen bakterieller sRNAs auf Studien in Enterobakterien wie z.B. *E. coli* oder *Salmonella*. Dagegen ist bislang nur wenig über die Organisation und Struktur des Transkriptoms sowie über post-transkriptionelle Regulation in Epsilon-proteobakterien, einschließlich weitverbreiteter Humanpathogene wie dem Magenkeim *Helicobacter pylori* oder *Campylobacter jejuni*, dem derzeit häufigsten Erreger bakterieller Lebensmittelkrankungen, bekannt. Zudem fehlt Epsilonproteobakterien wie 50% aller Bakterien ein Homolog des RNA-Bindeproteins Hfq welches eine zentrale Rolle in der RNA-Regulation bei Enterobakterien und in der Virulenzkontrolle bei Pathogenen spielt

Mittels eines differentiellen RNA-Sequenzierungsansatz (dRNA-seq), welcher eine genomweite Kartierung von Transkriptionsstartstellen erlaubt, haben wir ein unerwartet komplexes Transkriptionsmuster, sowie massive antisense Transkription und mehr als 60 in *H. pylori* entdeckt [1]. Vor kurzem konnten wir nun mittels einer vergleichenden dRNA-Seq- Analyse und einem neuen automatischen Ansatz zur Transkriptionsstartstellenbestimmung die Genstartpunkte in vier *C. jejuni* Isolaten kartieren und haben erste sRNAs in *Campylobacter* entdeckt [2]. Dieser vergleichende Ansatz zeigte zudem, dass Punktmutationen in Promoterregionen zu stammspezifischen Transkriptionsmustern führen können, sowie dass es stammspezifische Repertoires an regulatorischen sRNA gibt. Diese Transkriptomunterschiede

ABSTRACTS

können zu stammspezifischer Genregulation führen, und somit phänotypischen Unterschieden zwischen eng verwandten Stämmen zugrunde liegen und dadurch eine Kolonisierung von verschiedenen Wirten und Nischen fördern. Nun arbeiten wir an der funktionalen Charakterisierung von abundanten sRNAs in *C. jejuni* und ihrer Rolle in der Stressantwort und Virulenz sowie der Identifizierung von assoziierten Proteinfaktoren. Dies wird neue Einblicke in die Mechanismen von Genregulation und Virulenzkontrolle nicht nur von *C. jejuni* sondern auch anderen Pathogenen bringen.

Referenzen

- [1] Sharma, C.M., S. Hoffmann, F. Darfeuille, J. Reignier, S. Findeiss, A. Sittka, S. Chabas, K. Reiche, J. Hackermuller, R. Reinhardt, P.F. Stadler & J. Vogel, (2010) *The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori*. Nature 464: 250-255
- [2] Dugar G, Herbig A, Förstner KU, Heidrich N, Reinhardt R, Nieselt K, Sharma CM (2013) *High-resolution transcriptome maps reveal strain-specific regulatory features of multiple Campylobacter jejuni isolates*. PLoS Genetics 9(5):e1003495

Kommuniziert *Campylobacter* über AI-2?

Linda Adler¹, Thomas Alter¹, Soroush Sharbati², Greta Gölz¹

¹Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin

²Institut für Veterinär- Biochemie, Freie Universität Berlin

Seit dem Nachweis, dass *Campylobacter (C.) jejuni* Autoinducer-2 (AI-2) produziert, wurden zahlreiche Untersuchungen zur Funktion und Rolle von AI-2 in *C. jejuni* durchgeführt. Dabei werden von verschiedenen Autoren Analysen mit oft widersprüchlichen Ergebnissen präsentiert. In den jeweiligen Studien wurden unterschiedliche *C. jejuni* Stämme eingesetzt. Auch die unterschiedlichen Mutationsstrategien und Kulturbedingungen erschweren ein Vergleich und die Interpretation dieser Daten. Da bislang kein AI-2 Rezeptor in *C. jejuni* identifiziert werden konnte wurden sämtliche Studien von AI-2-abhängigen Phänotypen mit AI-2-Synthase (*luxS*)-Mutanten durchgeführt. Allerdings spielt LuxS auch eine zentrale Rolle bei der Regeneration von Homocystein im Methioninzyklus. Daher sollten die *luxS* Mutanten sowohl mit AI-2 als auch mit einer metabolischen Ersatzkomponente komplementiert werden, um zu zeigen, ob auftretende Phänotypen ein Resultat der Störung der metabolischen Funktion von LuxS sind oder sich diese als Konsequenz der Unterbrechung der AI-2 vermittelten Zellkommunikation zeigen. Ziel dieser Studie ist es, das Wachstum und die Schwärmfähigkeit von drei verschiedenen *C. jejuni luxS*-Mutanten bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C und 42°C) in verschiedenen Medien zu untersuchen. Unsere Studie zeigt, dass unterschiedliche Phänotypen von *C. jejuni luxS*-Mutanten abhängig vom Stammhintergrund, der Mutationsstrategie und den Kulturbedingungen sind. Die Komplementierung mit synthetischem AI-2 und AI-2 + Homocystein erhöhte die Zellzahl von *C. jejuni* NCTC 11168Δ*luxS* in der stationären Phase gegenüber der nicht komplementierten *C. jejuni* NCTC 11168Δ*luxS* Mutante. Die genetische Komplementierung beider *C. jejuni* 81-176 *luxS* Mutanten führte zu Wildtyp-vergleichbaren Wachstumskurven. Während die genetische Komplementierung die Schwärmfähigkeiten von *C. jejuni* 81-176Δ*luxS* wiederherstellte, konnte der Phänotyp von *C. jejuni* 81-176::*luxS* nicht vollständig komplementiert werden, was darauf hindeutet, dass potenzielle polare Effekte in dieser Mutante eine Rolle spielen. Mit der chemischen Komplementierung von AI-2 mit bzw. ohne Homocystein konnte das Schwärmverhalten von *C. jejuni* NCTC 11168Δ*luxS* und *C. jejuni* 81-176::*luxS* gesteigert werden, auch wenn das Wildtyp-Niveau nicht erreicht wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *C. jejuni* über

ABSTRACTS

AI-2 verschiedene Prozesse regulieren kann, auch wenn die genaue Funktionsweise noch nicht geklärt werden konnte.

Kolonisation
Pathogenese
Infektion II

Einfluss des Wirtsmetabolismus und der Mikrobiota auf das Kolonisierungsverhalten von *Campylobacter*

Juliane Mohr¹, Hanne Vorwerk¹, Claudia Huber², Petra Grüning³, Karen Methling⁴, Alexandra von Altrock⁵, Olga Wensel¹, Sabin Bhuj⁶, Kerstin Schmidt-Hohagen⁷, Josef Kamphues⁸, Dietmar Schomburg⁷, Thomas Alter⁹, Antje Flieger¹⁰, Michael Lalk⁴, Wolfgang Eisenreich², Peter Valentin-Weigand³ und Dirk Hofreuter¹

¹ Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene; ² Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München; ³ Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover; ⁴ Institut für Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; ⁵ Klinik für kleine Klautiere, Tierärztliche Hochschule Hannover; ⁶ AG Genomanalytik, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig; ⁷ Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig; ⁸ Institut für Tierernährung, Tierärztliche Hochschule Hannover; ⁹ Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin; ¹⁰ FG Bakterielle Infektionen, Robert Koch-Institut

Campylobacteriose ist eine der häufigsten bakteriellen Gastroenteritiden weltweit und wird primär von *Campylobacter jejuni* sowie deutlich seltener von *Campylobacter coli* verursacht. Interessanterweise zeigen beide *Campylobacter* Spezies eine unterschiedliche Verteilung im Gastrointestinaltrakt von Jungschweinen: *C. jejuni* besiedelt in erster Linie den Dünndarm, das Caecum und in deutlich geringerer Anzahl den Dickdarm, während *C. coli* vor allem aus dem Dickdarm, dem Caecum und Ileum aber nicht aus dem Jejunum von Schweinen isoliert werden kann. Mit dieser Arbeit wollten wir untersuchen, ob unterschiedliche metabolische Eigenschaften der beiden Krankheitserreger für die Fähigkeit von *C. coli*, besser als *C. jejuni* im Dickdarm persistieren zu können, verantwortlich sind.

Durch die Kombination von „Phenotype MicroArray“-Analysen, *in vitro* Wachstums-versuchen und „Isotopologue-Profilung“-Experimenten, konnten wir deutliche Unterschiede in der Verwertung von Wachstumssubstraten durch *C. jejuni* und *C. coli* identifizieren. Genomsequenzierungen einzelner *C. coli* Stämme erlaubten uns, diese Unterschiede in den katabolischen Eigenschaften genauer zu bestimmen. Wir komplementierten diese Untersuchungen mit Metabolomanalysen des Schweinedarms und konnten eine spezifische Verteilung bestimmter Nährsubstrate in den unterschiedlichen Abschnitten entlang des Darmtrakts nachweisen. Interessanterweise konnte *C. coli*, aber nicht *C. jejuni* verschiedene Substrate im Dickdarm von Schweinen für das Wachstum verwerten. Letztlich ergaben unsere

ABSTRACTS

Experimente, dass die Proliferation von *C. coli* deutlicher durch die metabolische Aktivität der Mikrobiota des Dickdarms unterstützt wird, als dies für *C. jejuni* der Fall ist. Mit dieser Studie konnten wir zeigen, wie die unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der nah verwandten *Campylobacter* Arten *C. jejuni* und *C. coli* deren speziesspezifischen Gewebetropismus im Gastrointestinaltrakt von Schweinen bestimmen können.

Suszeptibilität von *Campylobacter* gegenüber intestinalen antimikrobiellen Peptiden und Proteinen

Christiane Schmidt, Steffi Walter, Roman G. Gerlach

Robert Koch-Institut, Nachwuchsgruppe 3, Burgstrasse 37, 38855 Wernigerode

Hintergrund: Mit 63.646 Fällen im Jahr 2013 stellen Infektionen mit *Campylobacter* spp. die Hauptursache aller in Deutschland gemeldeten bakteriellen Enteritiden dar. Die meisten *Campylobacter*-Infektionen sind durch die Aktivitäten des angeborenen Immunsystems selbstlimitierend. Im Dünndarm ist *Campylobacter* ein hauptsächlich extrazellulärer Erreger mit einem ausgeprägten Tropismus für den intestinalen Mucus. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien können *C. jejuni* bevorzugt den Mucus in sonst sterilen Dünndarmkrypten sowohl im Hühnchen-Infektionsmodell Hlk378692855 [1] als auch bei gnotobiotischen Mäusen [2] besiedeln. Hohe Konzentrationen von antimikrobiellen Peptiden und Proteinen (AMPs) verhindern unter normalen Umständen die Besiedlung der Darmkrypten und schützen dadurch die dort befindlichen intestinalen Stammzellen. Paneth-Zellen in den Krypten sind für die Bildung großer Mengen AMPs verantwortlich und sekretieren diese in das Darmlumen. Die wichtigsten Vertreter dieser AMPs sind beim Menschen die α -Defensine HD-5 und HD-6 sowie Lysozym, Reg3 γ und sekretorische Phospholipase A₂ [3].

Fragestellung: Wir möchten experimentell überprüfen, inwieweit *Campylobacter* eine, aus den Beobachtungen in den Tiermodellen zu vermutende, erhöhte Resistenz gegenüber den AMPs der Paneth-Zellen besitzen. Weiterhin soll geklärt werden, ob die erhöhte Resistenz eine intrinsische Eigenschaft oder eine Konsequenz aus Anpassungsprozessen der Erreger darstellt. Ergebnisse: *C. jejuni* zeigt keine erhöhte Resistenz gegenüber den β -Defensinen HBD-2 und HBD-3 [4]. Diese AMPs werden von intestinalen Epithelzellen als Antwort auf invasive Pathogene exprimiert. Wir möchten ein *in vitro* Testsystem zur Untersuchung der Suszeptibilität verschiedener *Campylobacter*-Isolate gegenüber den konstitutiv exprimierten AMPs der Paneth-Zellen etablieren. Dabei sollen Verdünnungsreihen sowohl der einzelnen AMPs als auch verschiedener Kombinationen der AMPs eingesetzt werden. Mögliche Anpassungsprozesse sollen auf Transkriptionsebene durch geeignete Verfahren (z.B. RNA-Seq) weiter charakterisiert und dafür essentielle Komponenten identifiziert werden. Einen besonderen Fokus möchten wir dabei auf die Untersuchung von Änderungen im Transkriptionsprofil nach Exposition mit subletalen Dosen der intestinalen AMPs legen.

ABSTRACTS

Diskussion: Eine erhöhte Resistenz gegenüber intestinalen antimikrobiellen Peptiden und Proteinen könnte *Campylobacter* bei der Etablierung einer Darminfektion einen Kolonisierungsvorteil gegenüber der kommensalen Mikrobiota verschaffen. Durch Identifizierung der an der Resistenzausbildung beteiligten Komponenten möchten wir zu einem erweiterten Verständnis der Pathogenese von *Campylobacter* gelangen, aus dem möglicherweise neue Strategien zur Prävention der Infektion abgeleitet werden können.

Literatur: [1] Beery *et al.* (1988) *Appl. Environm. Microbiol.* 54, 2365-70. [2] Lee *et al.* (1986). *Infect. Immun.* 51, 536-46. [3] Salzman *et al.* (2007). *Sem. in Immunol.* 19, 70-83. [4] Zilbauer *et al.* (2005). *Infect. Immun.* 73, 7281-89.

Role of innate lymphoid cells in the protection against intestinal infections

Andreas Diefenbach

Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Mainz Medical Centre, Germany

Epithelial cells are the major port of entry for many viruses but the molecular networks protecting barrier surfaces against viral infections are incompletely understood. Recently, a cytokine receptor expressed by intestinal epithelial cells (i.e., the interferon-I receptor) was shown to be essential for host defense against epitheliotropic viruses such as rotavirus, which is the leading cause of childhood gastroenteritis. Here, we show that interleukin (IL)-22 production by group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) is required to restrict rotavirus replication in epithelial cells. IL-22 production by ILC3s was strictly dependent on the secretion of IL-1 α by infected epithelial cells. Surprisingly, IL-22-initiated STAT3 signaling in epithelial cells was dispensable for IL-22-mediated protection against the virus. Transcriptional analysis revealed that epithelial cells from rotavirus-infected *IL22*^{-/-} mice showed dramatically reduced expression of interferon-stimulated genes (ISGs) which are required to restrict virus replication and are widely believed to be induced by interferon (IFN)-I signaling. IL-22 alone was only a weak inducer of ISG expression but IL-22 in cooperation with the related cytokine IFN-I caused optimal phosphorylation of STAT1 and IL-22 was required to maintain STAT1 signaling upon rotavirus-induced downregulation of the IFN- α receptor. Cooperation between IL-22 and IFN-I signaling was needed for effective restriction of virus replication. These results represent a significant advance in our understanding of how mucosal cytokine networks cooperate for efficient antiviral immunity, and they may inform the design of novel immunotherapies of virus infections that are sensitive to IFNs such as hepatitis B and C viruses. Our data uncover new paradigms for the protection of epithelial cells against virus replication by co-opting the action of two evolutionarily related cytokine receptors exclusively expressed by epithelial cells that cooperate to restrict virus replication in intestinal epithelial cells.

Interaktion von *Campylobacter* mit dem Immunsystem des Huhns

Bernd Kaspers

Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität München,
Veterinärstr. 13, 80539 München

Campylobacter Infektionen haben in den letzten Jahren Infektionen mit Salmonellen als häufigste Ursache für Durchfallerkrankungen abgelöst. Die wichtigste Quelle für diese Infektionen ist Geflügelfleisch. Hühner gelten als natürlicher Wirt für *Campylobacter* und zeigen interessanter Weise auch bei hohen Bakterienzahlen im Darmtrakt keine pathologischen Symptome. Obwohl die Infektionen mit *Campylobacter* beim Geflügel seit vielen Jahren untersucht werden, ist bisher vollkommen unklar, wie dieser Status des Kommensalismus erreicht wird. Ursächlich hierfür ist sicher unser begrenztes Wissen über das mukosale Immunsystem, das Fehlen von Darmepithelzelllinien und von Methoden der reversen Genetik beim Huhn. Seit der Sequenzierung des Hühnergenoms würden aber auf all diesen Gebieten erhebliche Fortschritte gemacht.

Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass das mukosale Immunsystem des Zäkums durchaus auf eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* reagiert und binnen Stunden die aviären Homologe zu Interleukin-8 (IL-8) induziert werden. Überraschenderweise führt diese Reaktion aber nicht zu einer Infiltration des Gewebes durch heterophile Granulozyten (dem aviären neutrophilen Granulozyten). Allerdings haben verschiedene Studien gezeigt, dass es nach experimentellen Infektionen zu einer Immigration von Makrophagen in die Lamina propria des Zäkums kommt, die möglicherweise durch das aviäre IL-8 induziert wird. Unsere eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das Chemokin CCL16 nach einer Salmonelleninfektion im Zäkum massiv induziert wird und sehr wahrscheinlich die Migration von Monozyten in das Zäkum reguliert, jedoch dieses Chemokin bei einer *Campylobacter* Infektion nicht hochreguliert wird. Microarray basierte Untersuchungen haben zudem die Induktion zahlreicher weiterer inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-6 nachgewiesen und zudem gezeigt, dass die Expression verschiedener TLRs induziert wird. *In vitro* Studien mit Makrophagen bestätigen, dass diese Zellen auf eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* hin eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Faktoren sezernieren. Unverstanden bleibt allerdings, wieso es *in vivo* dennoch nicht zu einer deutlichen Entzündungsreaktion im Darm kommt.

Auch die Rolle des adaptiven Immunsystems ist erst in Ansätzen untersucht. Frühe Studien haben gezeigt, dass Hühner nach einer Infektion sowohl IgG als auch IgA Antikörper gegen

ABSTRACTS

Campylobacter bilden und dass Flagellin das immunodominante Antigen ist. Wie beim Säuger wird IgA auch beim Huhn in erheblichen Mengen in das Darmlumen sezerniert. Ob es an der Kontrolle der Invasion und Disseminierung der Bakterien beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Hier, wie auch bei der bisher gänzlich unverstandenen Rolle des T-Zellsystems, können neue Tiermodelle helfen die Relevanz der adaptiven Immunität besser zu verstehen. Gen knock out Tiere denen B-Zellen oder T-Zellen fehlen wurden bereits etabliert oder werden in näherer Zukunft verfügbar sein und Möglichkeiten bieten durch adoptiven Zelltransfer die Funktion einzelner Lymphozytenpopulationen in der *Campylobacter*infektion zu analysieren.

Friend or foe? Roles of microbial molecules in intestinal inflammation and homeostasis

Julia-Stefanie Frick

Medical Microbiology and Hygiene, University Hospital Tübingen,

The intestinal microbiota is crucial in pathogenesis of inflammatory intestinal diseases. It is unclear whether alteration of the intestinal microbiota may prevent intestinal inflammation. In children with Crohn's disease we found a decreased ratio of *Bacteroidetes* to *Escherichia coli* in intestinal microbiota. In a preclinical mouse model high number of intestinal *Bacteroidetes* resulted in mucosal immune homeostasis whereas high number of *E. coli* resulted in development of colitis. Therapeutic intervention shifting the ratio of *E. coli* versus *Bacteroidetes* resulted in prevention or exacerbation of colitis in mice. Mutations resulting in an altered Lipid A molecule of *E. coli* resembling Lipid A of *Bacteroidetes* demonstrated that a single Lipid A fatty acid accounts for the ability of *E. coli* to promote colitis. In conclusion we show that both the proportion of *Bacteroidetes* versus *E. coli*, and the Lipid A acylation are decisive factors of the intestinal microbiota assuring mucosal immune homeostasis.

Veränderung der Darmflora des Geflügels durch Besiedelung mit *Campylobacter jejuni*

Agathe Pfeifer, Barbara Gleiß, Dmitri Sofka, Friederike Hilbert

Institut für Fleischhygiene, Department/Universitätsklinik für Nutztiere und öff. Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmed. Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien, Österreich

Hintergrund

Campylobacter jejuni stellt weltweit den häufigsten bakteriellen Lebensmittelinfektionserreger dar und wird meist über kontaminiertes Geflügelfleisch auf den Menschen übertragen. Dieser mikroaerophile Pathogene ist an das Darmmilieu besonders gut adaptiert und verursacht kaum nachweisbare pathologische Veränderungen im Geflügeldarm, in welchem er zu hohen Zellzahlen anwächst, wohingegen er zu enteritischen Erscheinungen im menschlichen Darm führen kann (Awad et al., 2014, Kist und Bereswill, 2001). Eine in Mäusen vorhandene Resistenz, gegenüber der Kolonisierung durch *C. jejuni*, wurde in Abhängigkeit zu der mikrobiellen Darmflora dargestellt. Eine Änderung der autochtonen Darmflora in Mäusen kann somit zum Entstehen von klinischen Erscheinungen führen (Bereswill et al., 2011). *C. jejuni* ist es möglich mit anderen Bakterienspezies zu interagieren, um dabei Vorteile unter kritischen Überlebensbedingungen zu ziehen (Hilbert et al., 2010). Des Weiteren wurde durch eine Besiedelung mit *C. jejuni* in Mäusen eine Verschiebung der intestinalen Mikroflora detektiert (Haag et al., 2012).

Fragestellung

In wie weit die Darmflora des Geflügels, auf eine unter natürlichen Bedingungen basierende Besiedelung mit *C. jejuni* reagiert, wurde in dieser Studie untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Geflügelherden in Hinblick auf ihren *C. jejuni* Status mittels kultureller Methoden untersucht und qualitative bzw. quantitative Veränderungen der Darmflora mittels kultureller und molekularbiologischer Methoden verfolgt.

Ergebnisse

Mit kulturellen Nachweisverfahren wurden Geflügelkotproben und der Inhalt des Cäcums unterschiedlicher Geflügelherden über die gesamte Mastperiode auf das Vorhandensein von *C. jejuni* untersucht. Gleichzeitig wurden koloniebildende Einheiten pro Gramm Kot/Cäcuminhalt

ABSTRACTS

von *Enterobacteriaceae*, *E. coli* und Milchsäurebildnern in diesen Proben ermittelt und diese einer mikrobiologischen Gemeinschaftsanalyse, basierend auf der 16S rRNA Gen Differenzierung, unterzogen. Eine generell erhöhte Zellzahl der untersuchten Mikroorganismen (*E. coli*, *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebildner) zeigte sich bei gleichzeitigem Vorkommen von *C. jejuni* im Kot und den Cäcum Proben, unabhängig von Alter, Fütterung und der Mastsaison der Geflügelherden mittels kultureller Resultate, während die mikrobielle Gemeinschaftsanalyse auf eine qualitative Verschiebung der Darmflora in Richtung strikter Anaerobier bei gleichzeitiger *C. jejuni* Besiedelung hinweist.

Diskussion

Untersuchungen zur Mucosa-assoziierten Mikroflora im Geflügeldarmtrakt beschreiben einen besonderen Variantenreichtum im Cäcum des erwachsenen Geflügels. Vor allem Clostridien, *E. coli* (sowie andere *Enterobacteriaceae*) und Lactobazillen stellen den Hauptteil dieser Flora dar (Gong et al., 2006). In unserer Untersuchung wurde durch die Besiedelung mit *C. jejuni* im Cäcum, wie auch in fäkalen Proben, eine statistisch signifikant erhöhte Keimzahl von *Enterobacteriaceae*, *E. coli* und Milchsäurebildnern – aller kulturell ermittelten Bakterien – dargestellt, die unbeeinflusst von Fütterung, Untersuchungsaison und dem Alter (die natürliche Infektion fand ab der 2.-6. Mastwoche in den untersuchten Herden statt) der untersuchten Geflügel blieb. Einen Zusammenhang zwischen der Besiedelung mit *E. coli* und einer verminderten Kolonisierungsresistenz gegenüber *C. jejuni* wurde bereits im Mäusemodell berichtet (Haag et al., 2012). Gleichzeitig wurde in den Cäcum und Kotproben mittels mikrobiologischer Gemeinschaftsanalyse eine Verschiebung in Richtung strikter Anaerobier gesehen, die mit einem geringeren Variantenreichtum bei gleichzeitigem Vorkommen von *C. jejuni* einherging. Diese Veränderung war bei alleiniger Besiedelung mit *C. coli* nicht gegeben.

Diagnostik

Kultureller Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln – Möglichkeiten und Grenzen der Routinediagnostik

U. Messelhäuser, D. Thäringen, C. Fella, C. Höller, U. Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2,
85764 Oberschleißheim

Hintergrund. Thermophile *Campylobacter* spp. zählen zu den wichtigsten lebensmittelübertragenen Infektionserregern in Deutschland. Im Jahr 2013 wurden dem Robert-Koch-Institut (RKI) 63.646 Erkrankungsfälle übermittelt (RKI, 2014), was einer Inzidenz von 77,77 Fällen/100.000 Einwohner entspricht. Somit liegt die *Campylobacter*-Inzidenz ungefähr 3,4-mal höher als die im Jahr 2013 für *Salmonella*-Erkrankungen ermittelte Inzidenz (23,19 Erkrankungen/100.000 Einwohner). Da thermophile *Campylobacter* spp. klassischerweise für eine zoonotische Erkrankung verantwortlich sind und im Regelfall über Lebensmittel übertragen werden, besteht auch im Lebensmittelbereich die Notwendigkeit für schnelle und routinetaugliche Nachweisverfahren. Ein zuverlässiger, kultureller, qualitativer, aber auch quantitativer Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. stellt allerdings nach wie vor, zumindest bei einigen Lebensmittelmatrixen, eine diagnostische Herausforderung dar.

Fragestellung. Bei Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung muss für einen aussagekräftigen Befund ein kultureller Erregernachweis erfolgen. Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) wurden deshalb in den vergangenen Jahren neben dem derzeit aktuell gültigen Standardnachweisverfahren ISO 10272:2006 unterschiedliche Flüssig- und Festmedien in Kombination mit entsprechenden molekularen und immunologischen Screeningverfahren auf ihre Tauglichkeit in der Routinediagnostik an unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen tierischen und pflanzlichen Ursprungs getestet, um einen verbesserten kulturellen Nachweis zu ermöglichen. Ein ausschließlich molekularbiologischer oder immunologischer generiertes Ergebnis ist für eine lebensmittelrechtliche Bewertung nicht ausreichend.

Ergebnisse und Diskussion. Die Ergebnisse von Vergleichsuntersuchungen zwischen den klassischen, flüssigen Selektivmedien wie Preston- und Bolton-Bouillon sowie neu entwickelten Anreicherungsmedien, wie z. B. CampyFood Bouillon (CFB, Fa. BioMerieux) zeigen, dass keine der getesteten Selektivmedien bei natürlich kontaminierten Proben einen vollständig zufriedenstellenden, ausschließlich kulturbasierten Nachweis thermophiler *Campylobacter* spp. bei allen getesteten Lebensmittelmatrixen erlaubt. Die Kombination des kulturellen Nachweises

ABSTRACTS

mit einem entsprechenden Screeningverfahren sowie der Einsatz chromogener Medien bzw. von Filtrationstechnik führen allerdings bei allen verwendeten Anreicherungsmedien zu wesentlich höheren Isolierungsraten als der alleinige Einsatz der in der ISO 10272:2006 beschriebenen Kultivierungs- und Isolierungstechniken. Für einen schnellen und zuverlässigen, kulturbasierten Nachweis ist daher nach der derzeit vorliegenden Datenlage der Einsatz entsprechender Screeningtechniken zu empfehlen. Dabei muss man sich aber bewusst sein, dass die Sensitivität dieser Verfahren in der Regel so hoch liegt, dass bei einem Teil der im Screening positiven Proben, in Abhängigkeit von Matrix und Prozessierungsgrad des Lebensmittels, keine Isolierung des Erregers möglich ist.

Standardisierung von PCR-Systemen zur Detektion von *Campylobacter*

I. Huber, U. Messelhäuser, D. Thäringen, U. Busch

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

Thermophile *Campylobacter* Spezies treten weltweit als Hauptverursacher lebensmittelbedingter Infektionen auf. Als verursachende Spezies werden vor allem *Campylobacter (C.) jejuni* und *C. coli*, in geringerem Maße auch *C. lari* angesehen. Kontaminationen können in erster Linie in rohen oder nicht ausreichend erhitzten Geflügel- oder anderen Fleischprodukten, Muscheln, Rohmilch und Trinkwasser nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer zunehmenden Bedeutung sind schnelle und zuverlässige Nachweismethoden zum Screening von Lebensmitteln bezüglich einer *Campylobacter*-Kontamination und zur Aufklärung von humanen Ausbrüchen gefragt.

Für die methodische Erweiterung der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB wurden zwei real-time PCR-Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung thermophiler *Campylobacter spp* validiert. Beide Verfahren wurden erfolgreich einem Ringversuch unterzogen und sind seit 2013 als Methoden in der Amtlichen Sammlung publiziert (L 06.32-1 2013-08: Nachweis von *Campylobacter spp.* in Hackfleisch; real-time PCR-Verfahren).

Mit beiden real-time PCR-Methoden kann nach 48 Stunden Anreicherung der schnelle Nachweis thermophiler *Campylobacter spp.* durchgeführt werden. Eines der beiden real-time PCR-Verfahren kann zusätzlich eingesetzt werden, um die Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* zu differenzieren. Es werden die Ergebnisse des real-time PCR-Screenings von Lebensmittelproben aus der Routineanalytik des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) parallel zur konventionellen Diagnostik vorgestellt. Da mittels real-time PCR-Screening bereits nach zwei Tagen *Campylobacter*-positive Proben identifiziert werden, kann man die anschließenden Isolierungsschritte auf diese Screening-positiven Proben beschränken. Auch wenn in einem Teil der Fälle eine Isolierung des Erregers bei PCR-positiven Proben nicht möglich ist, können durch das „Negativ-Screening“ Zeit und Kosten gespart werden. Die Identifizierung der Isolate kann ebenfalls mit der real-time PCR durchgeführt werden. Somit stellt die real-time PCR-Analytik von *Campylobacter spp.* ein sicheres Verfahren zur Beschleunigung der Routinediagnostik und damit zur Erhöhung der Lebensmittelsicherheit dar.

ABSTRACTS

Literatur:

1. Josefsen MH, Jacobsen NR, Hoorfar J (2004), Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacter* spp., Appl. Env. Microbiol. 70 (6), 3588-3592
2. Mayr A, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U, Huber I (2010), Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food using multiplex real-time PCR, J. of Food Protection Vol 73, No 2, 241-250

Kultivierungs-unabhängige Quantifizierung lebender *Campylobacter* – „how dead is dead?“

Kerstin Stingl, Christiane Buhler, Nora-Johanna Krüger

Bundesinstitut für Risikobewertung, Abteilung Biologische Sicherheit, Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*, Diederisdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Hintergrund & Fragestellung

Die Anzahl anzüchtbarer *Campylobacter* (KbE) spiegelt nur unzureichend das tatsächliche Risiko von Lebensmitteln, eine Campylobacteriose hervorzurufen, wider; der anspruchsvolle Keim verliert (durch Stresseinwirkung) sukzessive seine Kapazität auf Selektivmedien quantitativ zu wachsen. Die Frage stellt sich, bei welchem Probenmaterial die KbE noch eine verlässliche Größe ist. Insbesondere Real-time PCR Methoden in Kombination mit DNA-interkalierenden Farbstoffen, welche die DNA-Amplifikation von toten Bakterien verhindern, sind prinzipiell geeignet, um eine erhöhte und damit realistische Quantifizierung von lebenden Bakterien zu erreichen. Allerdings sind das Verständnis der zugrundeliegenden Prinzipien und eine sich daraus ableitende adäquate Anwendung der jeweiligen Methode für die Interpretation der Ergebnisse essentiell.

Ergebnisse

Der natürliche Tod eines mikroaeroben und thermophilen Keims wird primär durch oxidativen Stress und Kälte verursacht. Die Kälte verhindert dabei zusätzlich Abwehr- bzw. Adaptationsmöglichkeiten des Keims durch Einschränkung oder sogar Verlust essentieller Enzymaktivitäten. Entlang der Lebensmittelkette – Primärproduktion, Schlachthof, Supermarkt – besitzt *Campylobacter* daher unterschiedliche physiologische Eigenschaften. Diese müssen bei der Auswahl der jeweilig passenden Detektionsmethode berücksichtigt werden. Die lebend/tot Differenzierung mittels interkalierender Farbstoffe basiert auf Unterschieden in der Membranpermeabilität lebender und toter Bakterien. Von unseren Ergebnissen zur Membranpermeabilität von *Campylobacter* unter verschiedenen Bedingungen leiten sich Grundprinzipien zur quantitativen Detektion von *Campylobacter* ab, die im Vortrag diskutiert werden sollen. Beispielsweise konnten wir zeigen, dass *Campylobacter* Propidiummonoazid (PMA) passiv aus der Zelle ausschließt. Ethidium-monoazid (EMA) hingegen dringt in lebende Zellen ein, insbesondere wenn diese einen (transient) reduzierten Metabolismus aufwiesen. Dies führt zu einer signifikanten Unterschätzung lebender *Campylobacter* auf Lebensmitteln,

ABSTRACTS

die im Vergleich zu den Laborstämmen unter Laborbedingungen abweichende metabolische Zustände aufweisen können. Für den Erfolg der Methode ist zudem ein möglichst geringes Restsignal toter Zellen wichtig. Wie von einem diffusionsabhängigen Prozess zu erwarten war (Eintritt von PMA in Bakterien mit Membranschädigung), war das Restsignal toter Zellen von der Inkubations-temperatur, -zeit und der PMA-Konzentration an der bakteriellen Membran abhängig. Die letztere kann in einer heterogenen Matrix, wie z. B. einer Hühnerfleisch-Abschwemmung, durch unterschiedliche Mengen an freier DNA, Protein und Zellgewebe stark variieren.

Diskussion

Zukünftig wird es von Interesse sein, den Bakterientod abweichend von der KbE, z. B. über die Anzahl „intakter und potentiell infektiöser Einheiten“ (IPIE) zu beschreiben und eine pragmatische Anwendung in der Lebensmittelüberwachung zu definieren. Aus unserer Sicht ist es dafür notwendig, eine interne Probenprozesskontrolle mit definierter Membranpermeabilität (= Bakterientod) zu generieren, die unabhängig von dem Zielorganismus quantifizierbar ist. Diese wird über eine Definition des Bakterientodes hinaus für den Abgleich von Variationen im Prozess dienen.

***Campylobacter jejuni* – Diagnostik (Proteomik)**

Andreas E. Zautner

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Kreuzberggring 57,
37075 Göttingen (azautne@gwdg.de)

MALDI-TOF basierte Massenspektrometrie von Mikroorganismen ermöglicht die Detektion von konstitutiv stark exprimierten – überwiegend ribosomalen – Proteinen. Die Identifikation von Biomarker-Massenvariationen infolge von allelen Isoformen dieser konstituiven Proteine bildet die Grundlage für eine neuartige Typisierungsmethode namens *Massenspektrometrie basierte Phyloproteomik* (MSPP), welche für die Subtypisierung von *C. jejuni* und *C. coli* eingesetzt wurde.

Die Grundlage für die MSPP-Typisierung bildet eine Aminosäuresequenz-Datenbank der verschiedenen allelen Isoformen, die aufgrund von nicht-synonymen Mutationen in den bei *Campylobacter* detektierbaren Biomarkergenen als Massenverschiebungen in der Überlagerung von kalibrierten MALDI-TOF-Massenspektren erkennbar sind. So kann für jedes bakterielle Isolat aus dem aufgezeichneten Massenspektrum eine Kombination von Aminosäuresequenzen abgeleitet werden, aus der man in Analogie zu vergleichsweise arbeitsaufwendigen Multilocus Sequenztypisierungs (MLST)-Methoden mit Hilfe des UPGMA-Algorithmus phyloproteomische Kladogramme errechnen kann.

Im Vergleich zu anderen Methoden wie der hierarchischem PCA-Clusterung von ICMS-Spektren, binären Massenmaxima-Profilen oder der Anwendung des *Single-Linkage-Cluster-Algorithmus* auf Massenmaxima-Listen lassen sich hier eindeutig reproduzierbarere Ergebnisse erzielen. Mittels MSPP konnten auf der Basis von 20 Biomarkerionen in einer sehr diversen Isolate-Sammlung 16 verschiedene *C. jejuni*-Sequenztypen identifiziert werden, womit die Differenzierungstiefe niedriger ist als beim 7-Loci-MLST. Die wesentlichen *C. jejuni* und *C. coli* Kladen sind jedoch suffizient unterscheidbar. Damit stellt, eine entsprechende Softwareimplementierung vorausgesetzt, *Campylobacter*-MSPP eine rasche und kostengünstige Subtypisierungsmethode dar, die im Rahmen von Ausbruchsgeschehen und für epidemiologische Untersuchungen eingesetzt werden kann.

***Campylobacter jejuni* – Diagnostik (Serodiagnostik)**

Andreas E. Zautner

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Kreuzberggring 57,
37075 Göttingen (azautne@gwdg.de)

Aufgrund molekularer Mimikry vor allem zwischen Antigenen des Lipooligosaccharids der *Campylobacter*-Zelloberfläche und menschlichen Strukturen können infolge einer akuten *Campylobacter*-infektion post-infektiöse reaktive Komplikationen auftreten. Zu den häufigsten *Campylobacter*-assoziierten reaktiven Erkrankungen gehört mit 34-49% der Fälle das Guillain-Barré-Syndrom (GBS). Aktuell werden vier Arten des GBS unterschieden: das Miller-Fisher-Syndrom (MFS), die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN), die akute inflammatorisch-demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) und die akute motorische und sensible axonale Neuropathie (AMSAN). Eine *Campylobacter*-Assoziation konnte jedoch nur für das MFS, die AMAN und die AMSAN demonstriert werden. Ursächlich sind hier Autoantikörper gegen Ganglioside der axonalen Zellmembran. Charakteristisch für das GBS sind aufsteigende, unterschiedlich stark ausgeprägte Lähmungen mit Beginn im Bereich der Bein- und Armmuskulatur (Tetraplegie) sowie leichtgradige Sensibilitätsstörungen. Das GBS ist mit erheblichen axonalen Schädigungen und einem vergrößerten Risiko für irreversible neurologische Beeinträchtigungen verbunden. Weitere *Campylobacter*-assoziierte reaktive Erkrankungen sind mit 44-62% der Fälle die Reaktive Arthritis sowie mit 23-40% der Fälle die chronische entzündliche Darmerkrankungen. Die ätiologischen Mechanismen für diese beiden reaktiven Erkrankungen sind jedoch nicht vollständig geklärt.

Die Diagnostik reaktiver Erkrankungen stützt sich neben der klinischen Untersuchung u.a. auf die Serodiagnostik, die im weitesten Sinne jedoch nur Indizien für die Diagnosefindung liefern kann.

Zum Nachweis *Campylobacter*-spezifischer Antikörper stehen aktuell verschiedene z.T. kommerzielle ELISAs und Immunoblots zu Verfügung. Als Antigene kommen hierbei neben Ganzzelllysaten und spezifischen Präparationen der äußeren Membran vornehmlich rekombinante Antigene wie das 18 kDa *Outer membrane protein* (OMP18), das 39 kDa Protein (P39), das *major outer membrane protein* (MOMP), und die *periplasmic-binding proteins* 1–4 (PEB1-4) zum Einsatz. Insbesondere die Antigene OMP18 und P39 haben sich hier als die Antigene mit der höchsten Sensitivität und Spezifität herausgestellt.

ABSTRACTS

Trotz alledem ist die Optimierung der *Campylobacter*-Serodiagnostik weiterhin eine bedeutende Forschungsthematik. So steht u.a die Suche nach weiteren Antigenen für die Serodiagnostik sowie die Einbindung von *Campylobacter*-Antigenen in Luminex-Panels für Durchfallerkrankungen und reaktive Arthritiden im Fokus.

Minimierungsstrategien bzw. Bekämpfungsmöglichkeiten

Aktuelle Ansätze zur Minimierung von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette

Günter Klein, Sophie Kittler, Wiebke Jansen, Eva-Maria Bügener, Yvonne Lehner und Felix Reich

Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Hintergrund

Die Minimierung von *Campylobacter* kann an verschiedenen Stellen der Lebensmittelkette einsetzen. Als effektiv wird die Verringerung der Belastung durch *Campylobacter* im Bestand beim Geflügel betrachtet, da nach quantitativen Risikoanalysen eine Reduzierung von Humanerkrankungen um ca. 50% bis über 90% durch 1-2 log-Reduktionen im Blinddarm erreicht werden kann.

Fragestellung

Die Zielstellung der eigenen Untersuchungen war daher, die Effektivität von Maßnahmen im Bestand und am Schlachthof für die Minimierung von *Campylobacter* beim Broiler zu evaluieren. Hierfür wurden in mehreren Feldstudien die Anwendung von Bacteriophagen, von organischen Säuren und von elektrolysiertem oxidierenden (EO) Wasser über das Tränkwasser geprüft. Die Auswirkungen auf die *Campylobacter*-Konzentration wurden in verschiedenen Matrices im Bestand und am Schlachthof untersucht. Begleitend wurden die Kolonisierung von Phagen-empfindlichen *Campylobacter*-Stämmen sowie Resistenzen gegen Phagen analysiert. Weiterhin wurden Anpassungen in der Schlachttechnologie wie Änderung der Brühwassertemperatur und alternative Wascheinrichtungen auf ihre Auswirkungen untersucht.

Ergebnisse

Phagen konnten im Feldversuch zu signifikanten Reduktionen im Caecum im Bestand und teilweise auf dem Schlachthof führen. Ähnliche Reduktionsraten konnten im Feldversuch durch organische Säuren im Tränkwasser bestätigt werden, allerdings nicht auf den Karkassen im Schlachthof. Durch EO-Wasser konnte das Tränkwasser von *Campylobacter* frei gehalten werden. Dieser Effekt setzte sich im Schlachthof fort, da Karkassen der behandelten Bestände signifikant niedrigere Konzentrationen aufwiesen. Die Erhöhung der Brühwassertemperatur konnte im Schlachthof die *Campylobacter*-Belastung senken, welche aber mit sensorischen Abweichungen verbunden war.

Diskussion

Anders als bei Salmonellen ist das Ziel bei *Campylobacter* nicht die Eliminierung sondern die quantitative Reduktion. Maßnahmen zur Minimierung im Bestand sind erfolgversprechend, sollten aber durch begleitende Schritte entlang der Lebensmittelkette ergänzt werden. Dabei sind auch Resistenzentwicklungen und Auswahl der Stämme bei der Phagenanwendung zu beachten sowie auch die Populationsdynamik von *Campylobacter*. Maßnahmen im Schlachthof sind begrenzt durch deren Auswirkungen auf die sensorische Qualität des Geflügelfleischs.

Trends in *Campylobacter* and *E. coli* contamination on broiler chicken carcasses during slaughtering

Ewa Pacholewicz^{1, 2}, Arno Swart³, Maarten Schipper³, Betty G. M. Gortemaker¹,
Jaap A. Wagenaar^{4, 5, 6}, Arie H. Havelaar^{1, 3}, Len J. A. Lipman¹

¹ Division Veterinary Public Health, Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, 3508 TD, The Netherlands

² MEYN Food Processing Technology B.V. Oostzaan, 1511 MA, The Netherlands

³ Centre for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, 3720 BA, The Netherlands

⁴ Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, 3508 TD, The Netherlands

⁵ Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Lelystad, The Netherlands.

⁶WHO-Collaborating Center for *Campylobacter*/OIE Reference Laboratory for *Campylobacteriosis*, Utrecht/Lelystad, The Netherlands.

Campylobacteriosis remains the most commonly reported zoonosis in the EU. A high fraction of the cases is attributed to broiler meat and this is a driving force to establish microbiological criteria for broiler meat to stimulate further control measures in the broiler meat chain. Such criteria were proposed to be set not only for *Campylobacter* but also for *E. coli*. Various studies have shown that *Campylobacter* and *E. coli* levels on broiler chicken carcasses after chilling differed between slaughterhouses. The reasons of such differences have not yet been fully identified. That calls for determination of the impact of slaughtering operations on bacterial contamination levels and identification of factors affecting these levels.

The aim of the study was to identify which processing steps in broiler slaughterhouses contribute to increases or decreases in *Campylobacter* and *E. coli* contamination levels and in particular how these may explain differences between batches and /or slaughterhouses.

Campylobacter and *E. coli* contamination levels on broiler chicken carcasses were measured in two broiler slaughterhouses over 21 trials. Positivity of the batches for *Campylobacter* was ascertained by farm visits prior to sampling in the slaughterhouses. The whole carcass rinse method was used to obtain *Campylobacter* and *E. coli* contamination levels after bleeding, scalding, defeathering, evisceration and chilling.

ABSTRACTS

The results of the study revealed that the initial external contamination level varied significantly between the sampled batches at each slaughterhouse. The external contamination level determined the contamination at the end of processing. The impact of the processing steps was regular (i.e. not significantly different between batches) at Slaughterhouse I but varied at Slaughterhouse II. The causes will be explored in further studies. The *Campylobacter* and *E. coli* contamination levels through the processing fluctuated. Scalding and chilling contributed to a significant decrease in *Campylobacter* contamination levels at both slaughterhouses. Evisceration contributed to increase in *Campylobacter* contamination level at Slaughterhouse I and defeathering at Slaughterhouse II. *E. coli* contamination during the processing at each slaughterhouse was similar to *Campylobacter* except for defeathering, where *E. coli* significantly decreased.

Overall, there was a significant reduction in *Campylobacter* and *E. coli* contamination levels over the whole slaughtering process. The results suggest that *Campylobacter* and *E. coli* contamination at the end of processing could be even more reduced by decreasing the contamination on the exterior of birds in the incoming batches and by reducing the contamination at the identified relevant steps.

Charakterisierung von virulenten *Campylobacter*-Phagen und deren Einsatzmöglichkeiten

Stefan Hertwig & Jens A. Hammerl

Bundesinstitut für Risikobewertung, Abt. Biologische Sicherheit, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Hintergrund

Virulente Bakteriophagen stellen eine vielversprechende Alternative dar, *Campylobacter* entlang der Lebensmittelkette zu bekämpfen. Allerdings müssen Phagen für Anwendungen einige Bedingungen erfüllen, damit sie sicher und effizient eingesetzt werden können. Neben guten lytischen Eigenschaften und einem breiten Wirtsspektrum sollten die Phagengenome stabil und frei von Nukleinsäuresequenzen mit Gefährdungspotential (z.B. Toxingene) sein.

Fragestellung

In diesem Projekt sollten *Campylobacter*-Phagen isoliert, charakterisiert und auf ihre Eignung zur Reduktion der Bakterien untersucht werden.

Ergebnisse

Wir haben eine Reihe von Gruppe II- und Gruppe III-Phagen (Genome ca. 180 bzw. 130 kb) aus Umwelt- und Lebensmittelproben isoliert und eingehend charakterisiert. Alle Gruppe II-Phagen lysierten Stämme von *C. jejuni* und *C. coli*, während Gruppe III-Phagen zwar ausschließlich *C. jejuni*, von dieser Spezies jedoch deutlich mehr Stämme als Gruppe II-Phagen lysierten. Auch bezüglich der Kinetik der Zellyse unterschieden sich die beiden Gruppen in den in vitro-Untersuchungen deutlich voneinander. Gruppe II-Phagen lysierten eine Bakterienkultur bereits nach ca. 9 Stunden (Reduktion um ca. 1 Zehnerpotenz), wohingegen die stärkste Lyse (Reduktion um ca. 3 Zehnerpotenzen) bei Gruppe III-Phagen erst nach ca. 24 Stunden eintrat. Der Grund hierfür dürfte die deutlich höhere Wurfgröße von Gruppe II-Phagen sein. Die höchste Reduktion insgesamt wurde nach einer sukzessiven Gabe eines Gruppe III- und eines Gruppe II-Phagen erzielt. Hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber verschiedenen pH-Werten und Temperaturen unterschieden sich die beiden Phagengruppen nur geringfügig.

Zur molekularbiologischen Analyse wurden Restriktionsmuster der Phagen verglichen und DNA-Hybridisierungen durchgeführt. Diese Studien ergaben, dass Phagen einer Gruppe sehr ähnlich, mit Phagen der jeweils anderen Gruppe aber kaum verwandt sind. Daher wurde

ABSTRACTS

exemplarisch je ein Gruppe II- (CP21) und ein Gruppe III-Phage (CP81) sequenziert. Auf Nukleotidebene zeigten die Phagen kaum Homologien zueinander. In beiden Phagen konnten keine Sequenzen mit Gefährdungspotential entdeckt werden. Einige ihrer Genprodukte offenbarten aber eine entfernte Verwandtschaft zu T4-artigen Phagen. Bei CP21 fiel auf, dass das Genom aus mehreren Modulen besteht, die durch lange, repetitive Sequenzen voneinander getrennt sind. Diesen Modulaufbau findet man auch bei anderen Gruppe II-Phagen, jedoch unterscheiden sich bei den Phagen die Abfolge und Orientierung der Module. Die Genome der bisher sequenzierten Gruppe III-Phagen zeigen keinen Modulaufbau, enthalten aber zahlreiche Gene für Homing-Endonukleasen, die ebenfalls Rekombinationen hervorrufen können. Zur Testung der Phagen im Tier wurden Reduktionsversuche mit Masthähnchen durchgeführt. Auch hier wurden die deutlichsten Reduktionen mit einer Kombination aus einem Gruppe II und einem Gruppe III-Phagen erzielt. Gegenüber dem Gruppe II-Phagen entwickelte der verwendete *C. jejuni*-Stamm nur geringe Resistenzen, während Gruppe III-Phagen höhere Resistenzraten hervorriefen.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich virulente *Campylobacter*-Phagen deutlich in ihrem Wirtsspektrum, ihren lytischen Eigenschaften und in den durch sie hervorgerufenen Resistenzen unterscheiden. Während die bis jetzt analysierten Genome keine Hinweise auf Sequenzen mit Gefährdungspotential ergaben, kann die Stabilität der Genome noch nicht als gesichert angesehen werden. Für eine Anwendung scheinen Cocktails, die Gruppe II- und Gruppe III-Phagen enthalten, besonders geeignet zu sein.

Shigatoxine von *Escherichia coli*: bakterielle Glykolipid-Rezeptor-Agonisten mit modulatorischer Wirkung

Christian Menge

Friedrich-Loeffler-Institut / Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für molekulare Pathogenese, Naumburger Strasse 96a, 07743 Jena

Bakterien, die die Darmschleimhaut von Säugetieren über lange Zeiträume kolonisieren, sind in Koevolution mit dem mukosalen Immunsystem entstanden. Dabei haben sie Pathogenitätsmechanismen entwickelt, die die Immunabwehr der Wirte modulieren. Zu den am besten charakterisierten bakteriellen Immunmodulatoren gehören die hitze-labilen Enterotoxine (LT) von *Escherichia coli* und das Cholera toxin (CT) von *Vibrio cholerae* mit einer 5B-plus-A-Grundstruktur. Die Holotoxine sind zwar wirksame Adjuvanzien, ihre Untereinheiten besitzen aber zum Teil gegenteilige immunologische Wirkungen. So stimulieren die Rezeptor-bindenden B-Untereinheiten die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Die rezeptor-vermittelte Endozytose der enzymatisch aktiven A-Untereinheit kann dagegen die Hemmung der Antigen-Prozessierung und die Induktion anti-inflammatorischer Zytokine bedingen. Obwohl auch eine Bindung an „Toll-like“-Rezeptoren diskutiert wird, wirken diese Immunmodulatoren vor allem über bestimmte Glykolipid-Rezeptoren (Ganglioside, v.a. GM1) der eukaryontischen Zellmembran.

Shigatoxine (Stx), die von Stx-bildenden *E. coli* (STEC; *syn.* enterohämorrhagische *E. coli*, EHEC) sezerniert werden, ähneln in ihrem Aufbau LT und CT. Aufgrund der hohen enzymatischen Aktivität der A-Untereinheit, die eine Hemmung der zellulären Proteinbiosynthese katalysiert, werden Stx vor allem zu den zytoletalen Toxinen gerechnet. In der Pathogenese des Hämolytisch-Urämischen Syndroms, einer gravierenden Manifestationsform der humanen EHEC-Infektion, kommt dieser Wirkung eine zentrale Bedeutung zu. Stx lösen aber unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität eine Vielzahl anderer zellulärer Reaktionen aus und wirken durch die Stimulierung dendritischer Zellen auch als Adjuvanz. Dabei dienen ebenfalls Glykolipide (Glykolipide der Globo-Serie) als zelluläre Rezeptoren.

Bei Infektionen von Rindern, die das wichtigste STEC-Reservoir darstellen, sind diese immunmodulierenden Wirkungen Wegbereiter für die Persistenz der Infektion. So stellen Epithelzellen, Makrophagen-artige Zellen und intraepitheliale Lymphozyten in der bovinen

ABSTRACTS

intestinalen Mukosa Zielzellen für Stx dar. Neben der Induktion der Transkription spezifischer Zytokin- und Chemokin-Gene üben die Stx vor allem eine inhibitorische Wirkung auf Lymphozyten aus. Aufgrund der Expression hochaffiner Isoformen des bovinen Stx-Rezeptors (Gb₃/CD77) besonders in der Frühphase der Lymphozytenaktivierung verzögert Stx die Entwicklung einer zellulären Immunität. Die Ausbildung einer adaptiven, STEC-spezifischen Immunantwort ist nach Infektion von Kälbern im Vergleich zu Tieren, die mit einem Stx-negativen *E. coli*-Stamm inokuliert wurden, verzögert. Bemerkenswert ist, dass sich diese modulierende Wirkung der Stx auf Zellen des adaptiven Teils des Immunsystems beschränkt, die im fortgeschrittenen Stadium der Immunantwort für die vollständige Entfernung des Mikroorganismus aus dem Wirt unabdingbar sind. Elemente des angeborenen Teils des Immunsystems werden von Stx dagegen nicht moduliert, so dass (räumlich und zeitlich begrenzte) Entzündungsreaktionen, die den auf der Mukosa kolonisierenden EHEC/STEC Nährstoffe zu erschließen helfen, nicht verhindert werden.

Der pathogenetischen Bedeutung der Immunmodulation durch bakterielle Glykolipid-Rezeptor-Agonisten für den Verlauf bakterieller Infektionen muss zukünftig besondere Beachtung geschenkt werden. Die Nutzung sowohl als mukosale Adjuvanzien als auch als Impfantigene zur Induktion einer antitoxischen Immunität könnte helfen die persistente Kolonisation der enteralen Mukosa mit Durchfallerregern bei Mensch und Tier zu reduzieren.

Arcobacter und ***Campylobacter fetus***

Adhäsive und invasive Eigenschaften von *Arcobacter butzleri* – in vitro Studien

Gül Karadas¹, Soroush Sharbati², Thomas Alter¹, Greta Gözl¹

¹Institute of Food Hygiene, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

²Institute of Veterinary Biochemistry, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Arcobacter sind bewegliche, spiralförmige Bakterien, die zu der Familie der *Campylobacteraceae* gehören. *Arcobacter* besiedeln zahlreiche ökologische Nischen und werden vermehrt in Gewässern, tierischen Organismen und Lebensmitteln nachgewiesen. Die Kolonisation im Tier erfolgt meist asymptomatisch, obwohl auch einige Erkrankungen wie Mastitis, Diarrhö und erhöhte Abortraten auf die Infektion mit *Arcobacter* im Tier zurückzuführen sind. Die für humane Erkrankungen höchste Relevanz haben die Spezies *Arcobacter* (*A.*) *butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Die klinische Symptomatik einer humanen *A. butzleri*-Infektion wird mit abdominalen Krämpfen und lang anhaltenden wässrigen Durchfällen beschrieben. Obwohl in dem Genom von *A. butzleri* RM4018 10 putative Virulenzgene nachgewiesen wurden, ist bislang noch ungeklärt, welche Virulenzfaktoren für die Klinik verantwortlich sind. Das Ziel dieser Studie ist es, die Verbreitung der 10 putativen Virulenzgene in *A. butzleri*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft sowie mögliche Pathogenitätsmechanismen zu beschreiben. Von den 10 putativen Virulenzgenen konnten sechs Gene, die Homologien zu *Campylobacter* aufweisen, in allen 50 untersuchten *A. butzleri*-Isolaten mittels PCR nachgewiesen werden. Da zu diesen Virulenzfaktoren sowohl die Adhäsine CadF und Cj1349 sowie das Invasions-Antigen CiaB gehören, wurden die adhäsiven und invasiven Eigenschaften von sechs *A. butzleri*-Isolaten an unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion sowohl von dem jeweiligen *A. butzleri*-Isolat als auch von der untersuchten Zelllinie abhängig war. Die höchsten Adhäsions- und Invasionsraten konnten für die humanen Colocarcinoma-Zelllinien Caco-2 und HT-29 ermittelt werden. In der porcinen Dünndarm-Zelllinie IPEC waren die Raten und die Anzahl der invasiven *A. butzleri*-Isolate deutlich geringer. Die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Adhäsion und Invasion der Isolate ließen sich nicht auf eine Veränderung der Aminosäuresequenz der jeweiligen Gene zurückführen. Der Nachweis der adhäsiven und invasiven Eigenschaften von *A. butzleri* unterstreicht jedoch den Hinweis auf das pathogene Potenzial von *A. butzleri*.

***Arcobacter butzleri* induces pro-inflammatory immune responses in the intestinal tract of gnotobiotic IL-10-/- mice upon peroral infection**

Greta Gölz¹, Gül Karadas¹, André Fischer², Ulf B. Göbel², Thomas Alter¹, Stefan Bereswill², Markus M. Heimesaat²

¹Department of Department of Veterinary Medicine, Institute of Food Hygiene, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

²Department of Microbiology and Hygiene, Charité - University Medicine Berlin, Berlin, Germany

Background

Arcobacter and *Campylobacter* are closely related Gram-negative bacterial species. We have recently shown that *C. jejuni* induces acute ulcerative enterocolitis in gnotobiotic IL-10-/- mice within one week upon peroral infection mimicking key features of severe campylobacteriosis in humans. The pathological relevance of *Arcobacter* in human gastrointestinal disease, however, is of current debate. Furthermore, *in vivo* studies investigating the immunopathological impact of *A. butzleri* in vertebrates are lacking.

Methodology/Principal Findings

To address this, gnotobiotic IL-10-/- mice were generated by broad-spectrum antibiotic treatment and perorally challenged with either 10E9 colony forming units (CFU) of *A. butzleri* strain H1 (isolated from an infected human) or C1 (derived from infected chicken) on two consecutive days. One week following infection with either strain mice harboured the respective *A. butzleri* strain within the small and large intestines but did not display clinical symptoms such as bloody diarrhea as seen in *C. jejuni* infected gnotobiotic IL-10-/- mice. Interestingly, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IFN- γ , MCP-1, and IL-6 were higher in *ex vivo* ileal and colonic biopsies taken from *A. butzleri* infected as compared to uninfected mice. Interestingly, increases in intestinal cytokine levels upon *A. butzleri* infection were more pronounced in H1 strain as compared to C1 strain infected mice. We are currently investigating the quantitative abundance of distinct immune cell population in intestinal paraffin sections applying *in situ* immunohistochemistry. Strikingly, *Arcobacter* induced inflammatory responses were not restricted to the intestines given that pro-inflammatory cytokines were also increased in serum samples derived from *A. butzleri* infected versus naïve mice.

ABSTRACTS

Conclusion/Significance

A. butzleri induces intestinal and systemic pro-inflammatory immune responses one week following peroral infection in the gnotobiotic IL-10^{-/-} mouse model. Further studies should unravel the immunopathological impact of *Arcobacter* in humans.

Wirkungen von *Arcobacter* auf die intestinale Barrierefunktion

Roland Buecker¹, Hanno Troeger², Michael Fromm¹, Jörg-Dieter Schulzke¹

¹Institut für Klinische Physiologie, ²Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin (roland.buecker@charite.de)

Hintergrund

Arcobacter butzleri ist ein Bakterium, das im Verdacht steht, ein humanpathogener Erreger von wässriger Diarrhö und Sepsis zu sein. Wie auch *Campylobacter* werden die Bakterien vornehmlich aus kontaminierten Lebensmitteln wie z.B. Geflügel- oder Schweinefleisch isoliert. Dabei ist der Darm das Habitat der Bakterien. Die Darstellung des Keims als zoonotischer Erreger ist allerdings bisher noch nicht eindeutig belegt.

Fragestellung

Obwohl mehrere Ausbrüche infektiöser Diarrhöen mit *Arcobacter* in Verbindung gebracht werden konnten, ist wenig bekannt über das pathogene Potential des Bakteriums. Die Identifizierung der pathogenen Eigenschaften von *Arcobacter butzleri* war das Ziel dieser Studie. Hierzu wurden *in vitro* Experimente am Epithelzellmodell durchgeführt. Monolayer von humanen Kolonepithelzellen (HT-29/B6) wurden mit *A. butzleri* infiziert und der transepitheliale elektrische Widerstand, der Kurzschlussstrom und Markermolekülfluxe in Ussing-Kammern gemessen. Zytotoxische Effekte wurden analysiert und die Expression von Tight Junction-Proteinen mittels Western Blotting und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie dargestellt.

Ergebnisse

Die Infektion von konfluenten HT-29/B6 Monolayern führte zu einer Erniedrigung des transepithelialen Widerstands. Dabei wurde kein Anstieg im Strom gemessen wie es für eine sekretorische Störung charakteristisch wäre. Die parazelluläre Leitfähigkeit/Permeabilität gegenüber Fluoreszein (332 Da) und FITC-Dextran (4 kDa) war erhöht. Als strukturelles Korrelat dieser epithelialen Barriestörung war die Expression der Tight Junction-Proteine Claudin-1, -5, and -8 vermindert. Zusätzlich zeigte sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie eine Umverteilung von Claudin-1 und -8. Darüber hinaus war die Rate an epithelialen Apoptosen verdreifacht. Die Effekte zeigten sich in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Weise

und konnten zum Teil auch durch Proteinpräparationen aus den Bakteriensuspensionen erzeugt werden.

Diskussion

Arcobacter butzleri induzierte pathologische Veränderungen im Zellmodell, die die wässrige Diarrhö ihrem Mechanismus nach als Leckflux-Störung einzuordnen erlaubten. Die Barrierestörung war charakterisiert durch eine definierte Claudin-Fehlregulation und durch die Induktion von epithelialen Apoptosen, die *Leaks* darstellen. Der Nachweis, dass *A. butzleri* ein Pathogen oder Pathobiont als Teil der kommensalen Mikrobiota ist, ist in weiteren *in vivo* Studien zu erbringen.

Horizontally acquired genetic elements drive genome evolution, virulence, and niche specificity in *Campylobacter fetus*

Sabine Kienesberger^{1,2,3}, Hanna Sprenger^{1,3}, Ellen L. Zechner¹ and Gregor Gorkiewicz³

¹Institute of Molecular Biosciences, University of Graz, Graz, 8010, Austria.

²Department of Medicine, NYU Langone Medical Center, New York, United States of America.

³Institute of Pathology, Medical University of Graz, Graz, 8036 Austria.

Campylobacter fetus are important animal and human pathogens and the two major subspecies differ strikingly in pathogenicity. *C. fetus* subsp. *venerealis* is highly niche-adapted, mainly infecting the genital tract of cattle. *C. fetus* subsp. *fetus* has a wider host-range, colonizing the genital- and intestinal-tract of animals and humans. Comparative genomics has revealed that the two subspecies are highly syntenic at the genome level but differ in genetic regions mainly acquired by horizontal gene transfer (e.g. genomic islands). Unique genes in both subspecies comprise two known functional groups: lipopolysaccharide production, and type IV secretion machineries. Analyses of lipopolysaccharide-biosynthesis genes in *C. fetus* isolates showed linkage to particular pathotypes. Mutational inactivation of "subspecies-specific" genes demonstrates their roles in regulating virulence and host range.

References

Kienesberger S, Sprenger H, Wolfgruber S, Halwachs B, Thallinger GG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Zechner EL, Gorkiewicz G. 2014. Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity. *PLoS One*. 9;9(1):e85491.

Sprenger H, Zechner EL, Gorkiewicz G. 2012. So close and yet so far - Molecular Microbiology of *Campylobacter fetus* subspecies. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2(1):66-75.

Kienesberger S, Schober Trummler C, Fauster A, Lang S, Sprenger H, Gorkiewicz G, Zechner EL. 2011. Interbacterial macromolecular transfer by the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* type IV secretion system. *J Bacteriol*. 193(3):744-58.

Kienesberger S, Gorkiewicz G, Wolinski H, Zechner EL. 2011. New molecular microbiology approaches in the study of *Campylobacter fetus*. *Microb Biotechnol*. 4(1):8-19.

ABSTRACTS

Gorkiewicz G, Kienesberger S, Schober C, Scheicher SR, Gully C, Zechner R, Zechner EL. 2010. A genomic island defines subspecies-specific virulence features of the host-adapted pathogen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *J Bacteriol.* 192(2):502-17.

POSTER

Identification and characterization of virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni*

A. Malik Tareen, Andreas E. Zautner, Uwe Groß, and Raimond Lugert

University Medical Center Göttingen, Institute for Medical Microbiology, Kreuzberggring 57, 37075 Göttingen, Germany

To identify genes that contribute to the infectivity of *C. jejuni*, we screened a transposon generated mutant library of the pathogen performing gentamicin protection assays. Thereby, we detected several genes which add significantly to the competence of *C. jejuni* to invade host cells. Three of them have been subject of further characterization in detail.

Gene *cj0952c* represents the N-terminus of the chemoreceptor that mediates chemotaxis to formic acid. Consequently, this particular function is linked to the motility of *C. jejuni* which, in turn, is an essential requirement for infectivity.

cj0005c together with *cj0004c* constitutes the sulphite:cytochrome c oxidoreductase (SOR) which enables *C. jejuni* to respire sulphite. The lack of *cj0005c* associated with restricted energy metabolism also leads to reduced motility and diminished adherence probably due to the downregulation of genes which are important for the composition of the flagellar apparatus or the synthesis of the adherence factor legionaminic acid.

Finally, we characterized *cj0268c* as a gene which encodes for a protein that directly enhances the capability of *C. jejuni* to adhere to host cells. Whereas *cj0268c* has no effect on autoagglutination or motility, it governs even the adherence potential of *E. coli* if expressed in this bacterium.

NOTES
