

Intensivierte genombasierte Surveillance von *Campylobacter*-Isolaten humaner Erkrankungsfälle in Deutschland

1. Einleitung

Campylobacter ist ein wichtiger Infektionserreger des Menschen und die Campylobacteriose stellt die häufigste meldepflichtige bakterielle Zoonose in Europa dar.¹ In Deutschland werden jährlich ca. 60.000 Erkrankungsfälle gemäß §7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) gemeldet. Die Gattung *Campylobacter* (*C.*) umfasst derzeit 33 verschiedene Spezies, wobei *C. jejuni* (84 %) und *C. coli* (10 %) die Hauptverursacher von menschlichen Infektionen sind.¹ Als Infektionsquellen werden hauptsächlich kontaminierte tierische Lebensmittel, meist Huhn, ermittelt oder vermutet.² Die Infektion ist typischerweise selbstlimitierend und auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt. In seltenen Fällen (1–5 %) können auch extraintestinale Manifestationen wie Blutstrominfektionen oder reaktive Arthritiden auftreten.^{3,4} *C. jejuni* stellt mit 25–50 % außerdem die Hauptursache des seltenen Guillain-Barré-Syndroms, einer akuten entzündlichen Polyneuropathie, dar.⁵ Aufgrund der zu allererst selbstlimitierenden Natur der Campylobacteriose wird eine antimikrobielle Therapie im Regelfall nicht empfohlen.⁴ Nur bei länger anhaltender Erkrankung oder schwerwiegender Symptomatik ist eine Behandlung mit Azithromycin (erste Wahl; gehört zur Gruppe der Makrolide) oder Ciprofloxacin (Gruppe der Fluorchinolone) indiziert.^{4,6} Der aktuelle Bericht des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC)/der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) gibt an, dass die durchschnittlichen Resistenzraten für Erythromycin, das stellvertretend für die Gruppe der Makrolidantibiotika getestet wird, bei 1,5 % für *C. jejuni* bzw. 12,5 % für *C. coli* liegen.⁷ Allerdings liegt die Ciprofloxacin-Resistenzrate mit durchschnittlich 60 % bei *C. jejuni* und *C. coli* deutlich höher, was die antibiotischen

Therapiemöglichkeiten einschränkt.⁷ Daher wurden Fluorchinolon-resistente *Campylobacter* spp. in die „Erregerliste als Entscheidungsgrundlage zur Einstufung eines Antibiotikums als Reserveantibiotikum nach §35A ABS. 1C SGB“ aufgenommen. Solche Reserveantibiotika sind von der Nutzenbewertung durch den Gemeinsamen Bundesausschuss (G-BA) freigestellt.

Aufgrund der bedeutenden Rolle der Campylobacteriose in Deutschland wurde im Jahr 2019 die Etablierung einer intensivierten molekularen Surveillance von *Campylobacter* aus menschlichen Infektionen in Deutschland am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch-Institut (RKI) initiiert. Das vorrangige Ziel war die erweiterte Akquise von Isolaten mit epidemiologischen Basisdaten, um die Repräsentativität der Einsendungen bewerten und ebenso die systematische Untersuchung der Erreger möglichst bis hin zur Genomebene vornehmen zu können. Zur Gewinnung von *Campylobacter*-Isolaten wurden bundesweit eine Reihe von Primärlaboren einbezogen. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der bisher gewonnenen Daten bezüglich der (endemischen) Erregervielfalt und Ausbruchserkennung (Clusterdetektion) dargestellt.

2. Methode

Campylobacter spp. wurden auf *Campylobacter*-Selektivagar-Platten (CCDA) ausgestrichen und Einzelkolonien nach 48 stündiger Inkubation unter reduzierter Sauerstoffkonzentration (5 % O₂, 10 % CO₂) in biphasischem Medium, d. h. *Brucella*-Agar überschichtet mit *Brucella*-Flüssigmedium in einer Zellkulturflasche über Nacht angezogen. Die so her-

gestellten Übernachtkulturen wurden für weitere Analysen eingesetzt.

Für die Extraktion der genomischen DNA wurde 1 ml einer Übernachtkultur mit Hilfe eines Kits gemäß den Herstellerangaben verarbeitet. Die Bestimmung der Gattung und der Spezies erfolgten mit Hilfe von PCR unter Verwendung designierter Primer (Gattung: SEQ ID 11 & 12, *C. jejuni*: SEQ ID 1 & 2, *C. coli*: SEQ ID 3 & 4) veröffentlicht im Patent US20060051752A1. Die Ganzgenom-Sequenzierung wurde unter Einsatz von 1 ng genomischer DNA durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzdaten konnte mit Hilfe des Programms Ridom SeqSphere durchgeführt werden.

Die Resistenztestung erfolgte nach der Mikrodilutionsmethode nach Vorgaben des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), mit der Ausnahme, dass statt des vorgegebenen Mueller-Hinton Mediums mit 5 % Pferdeblut *Brucella*-Medium verwendet wurde. Für die Ermittlung der dargestellten Resistenzquoten wurden die im Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland von 2015 (Germap 2015, Tabelle 4.2.5.1) veröffentlichten Grenzwerte verwendet.¹¹

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Anzahl und Speziesverteilung der eingesandten *Campylobacter*-Isolate

Im Jahr 2020 hat das NRZ insgesamt 1.299 *Campylobacter*-Isolate aus menschlichen Infektionen für die Surveillance und zur Subtypisierung erhalten. Mehr als 25 verschiedene Labore haben Isolate beigetragen. Demnach waren 84 % der Isolate *C. jejuni*, 15 % *C. coli*, 0,5 % *C. fetus*, 0,3 % *C. hyointestinalis* und 0,1 % *C. upsaliensis*. Der Anteil an *C. jejuni* und *C. coli* entspricht somit annähernd der gemäß IfSG für 2019 erfassten Daten: 73 % *C. jejuni*, 10 % *C. coli*, 14 % *C. jejuni/C. coli* (nicht differenziert) und 0,2 % andere *Campylobacter*-Spezies.⁸

Parallel zur Analyse der Erreger wurden die verfügbaren epidemiologischen Meta- oder Basisdaten ausgewertet. Ab Mai 2020 trugen mindestens 10 La-

bore pro Monat zu den Erregereinsendungen bei. Zudem konnte im Vergleich zu den ersten vier Monaten die Zahl der Einsender ab Mai 2020 von durchschnittlich sechs auf 15 pro Monat erhöht und damit mehr als verdoppelt werden. Dementsprechend stieg auch die Zahl der Einsendungen von durchschnittlich 33 pro Monat im Zeitraum von Januar–April 2020 auf durchschnittlich 146 pro Monat von Mai–Dezember 2020, was etwa einer Vervierfachung entspricht. Die besonders hohe Zahl der Einsendungen im Juni und Juli 2020 (blaue Säulen in Abb. 1), ist wahrscheinlich auf die Saisonalität der *Campylobacteriose* mit einer Häufung im Sommer zurückzuführen (blaue Linie in Abb. 1).

In den letzten Jahren vor 2020 wurden durchschnittlich 365 *Campylobacter*-Isolate/Jahr (fast ausschließlich *C. jejuni* und *C. coli*) am NRZ typisiert. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass durch den Aufbau der intensivierten molekularen Surveillance die Zahl der Einsendungen im Jahr 2020 im Vergleich zum Durchschnitt der Jahre 2010–2019 mehr als verdreifacht werden konnte. Die Zahl der Meldetfälle der *Campylobacter*-Enteritis (nicht nach Falldefinition gefiltert) zeigt ab 2017 einen abnehmenden Trend, der im Jahr 2020 noch stärker absinkt. Der Grund für diesen starken Abfall der Meldezahlen im Jahr 2020 könnte, wie auch für andere Erkrankungen beschrieben, mit den Beschränkungen des öffentlichen Lebens zur Eindämmung der Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)-Pandemie zusammenhängen.^{9,10} Die Einsendungen an das NRZ repräsentieren ca. 2 % der *Campylobacter*-Enteritis-Meldetfälle des Jahres 2020 (Quelle: <https://survstat.rki.de>). Während die Einsendungen aus den Jahren 2010–2018 hauptsächlich aus einem Partnerlabor in Göttingen stammten, haben wir seit 2019 die Anzahl der Einsender deutlich erweitern können.

3.2 Geografische Abdeckung

Eine wichtige Kenngröße aussagekräftiger Surveillance stellt die geografische Repräsentation des Zielgebiets, hier Deutschland, dar. Abbildung 3 zeigt den Anteil der Bundesländer an den 1.299 eingesandten *Campylobacter*-Humanisolaten im Vergleich zu deren Anteil an den 55.831 Meldetfällen des Jahres 2020. Die an das NRZ eingesandten Isolate decken den mittleren Teil Deutschlands mit Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Thüringen, Berlin und Bran-

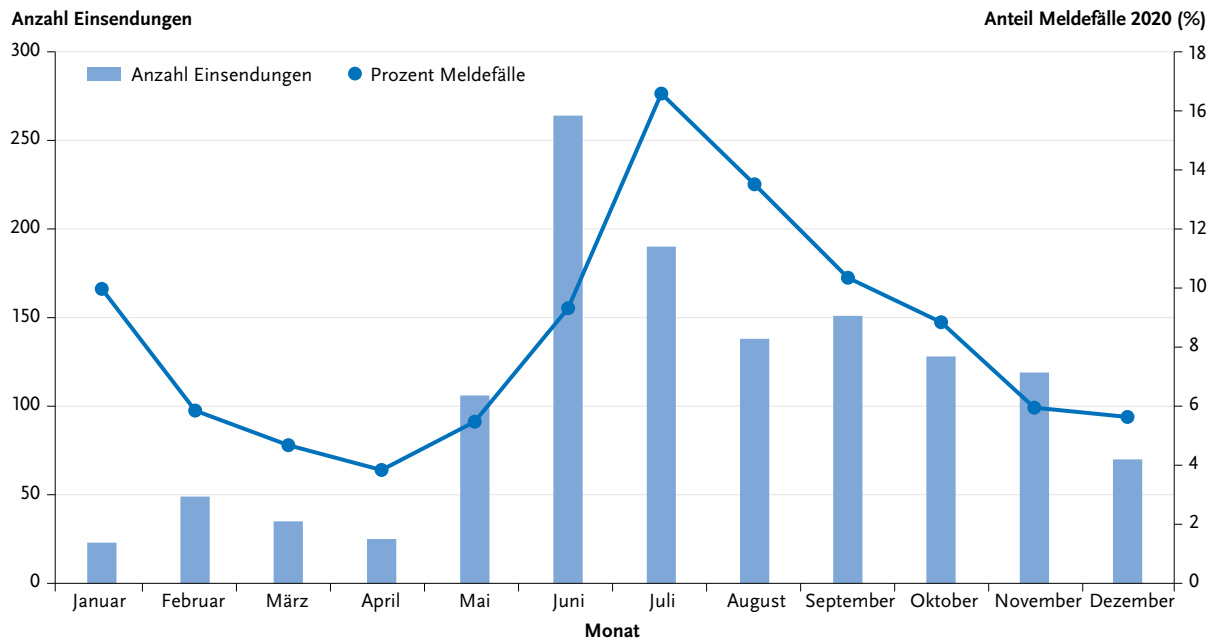


Abb. 1 | Anzahl eingesandter *Campylobacter*-Isolate pro Monat (blaue Säulen) sowie monatlicher Anteil an Meldefällen gemäß IfSG (blaue Linie) aus SurvStat (nicht nach Falldefinition gefiltert) für 2020 (<https://survstat.rki.de>, abgerufen am 17.1.2021).

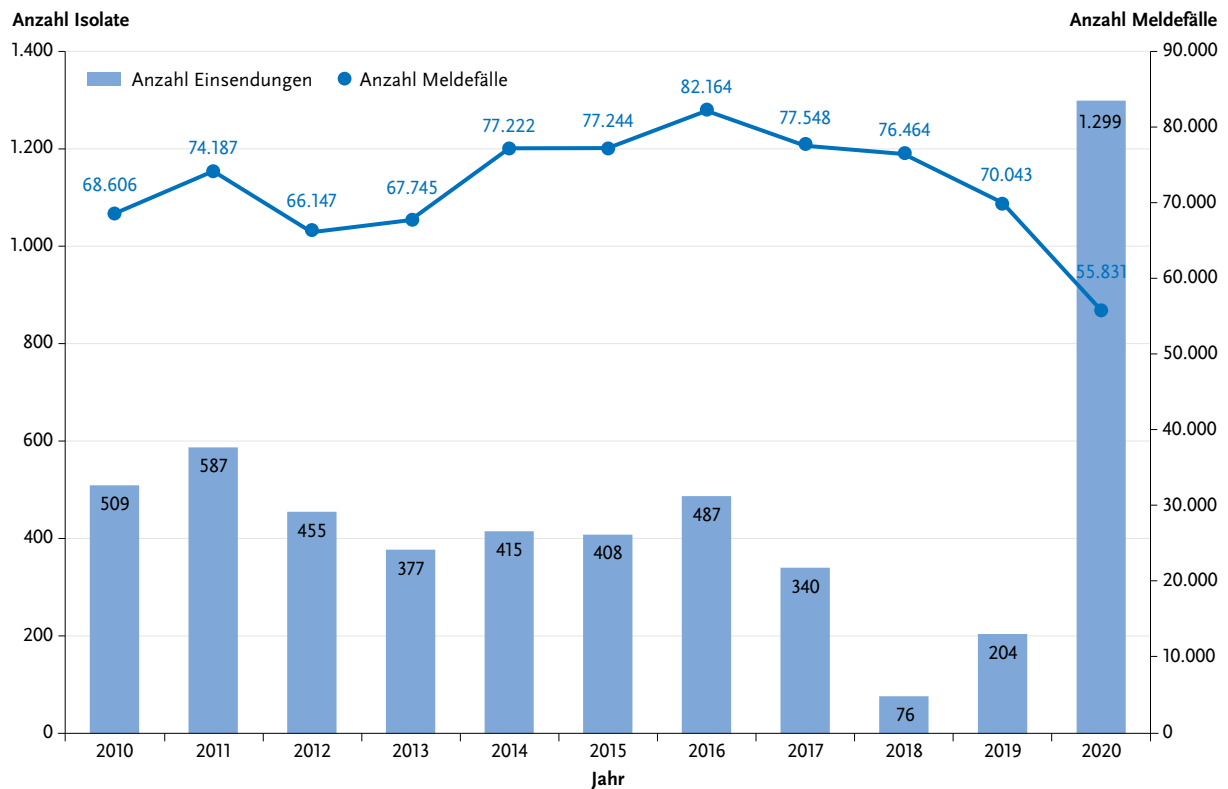


Abb. 2 | Anzahl eingesandter *Campylobacter*-Isolate (blaue Säulen) in den letzten zehn Jahren und die entsprechenden Meldefälle gemäß IfSG (blaue Linie) aus SurvStat (nicht nach Falldefinition gefiltert) (<https://survstat.rki.de>, abgerufen am 17.1.2021).

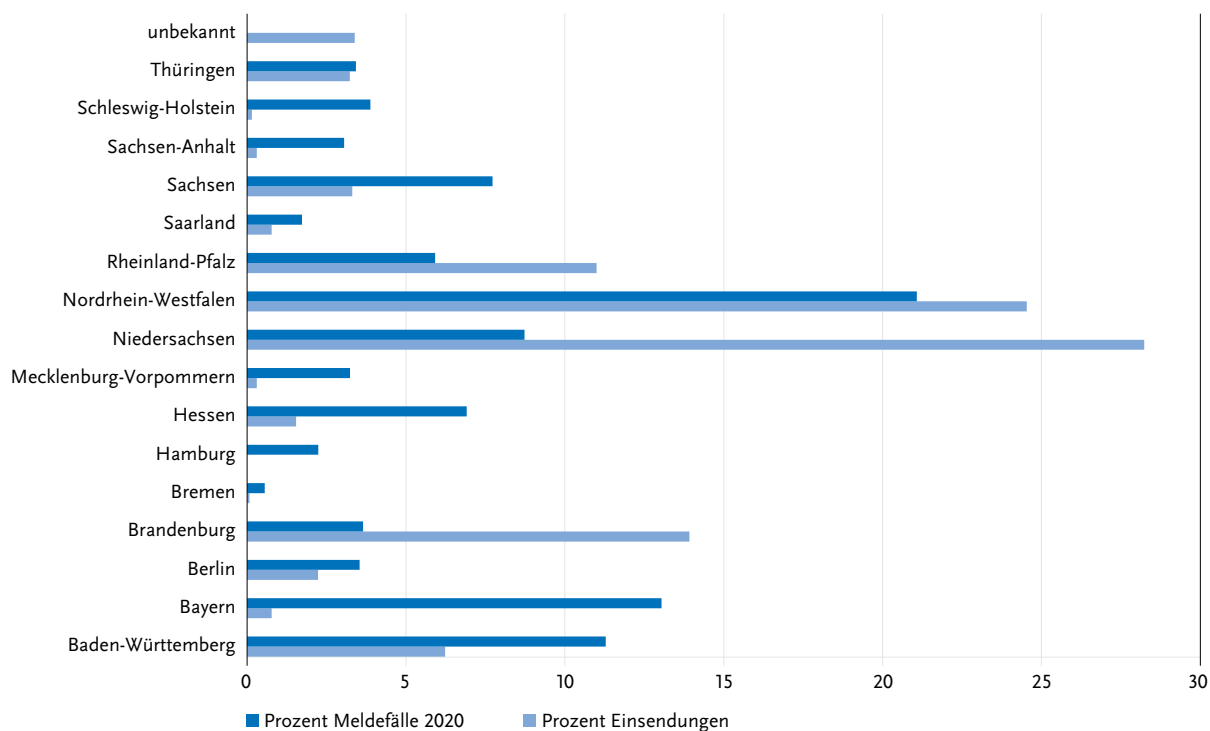


Abb. 3 | Prozentualer Anteil der Bundesländer an den 1.299 an das NRZ eingesandten *Campylobacter*-Humanisolate (hellblaue Balken). Prozentualer Anteil der Bundesländer an den 55.831 Meldefällen gemäß IfSG von *Campylobacter*-Enteritis des Jahres 2020 (dunkelblaue Balken) aus SurvStat (nicht nach Falldefinition gefiltert) (<https://survstat.rki.de>, abgerufen am 17.1.2021).

denburg sehr gut ab. Gerade mit der Abdeckung Nordrhein-Westfalens, das 21% der *Campylobacter*-Enteritis-Meldefälle verzeichnete, ist ein wichtiges Bundesland gut repräsentiert. Andererseits ist der Süden Deutschlands bisher nur durch Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg abgedeckt. Daher ist es ein dringendes Anliegen, weitere mitwirkende Labore aus den südlichen Gebieten, insbesondere Bayern und Hessen, sowie auch die nördlichen Bundesländer, die bisher kaum mit Einsendungen präsent sind, zu gewinnen. Es ist hervorzuheben, dass die bereits teilnehmenden Labore eine hervorragende Arbeit leisten.

3.3 Resistenzeigenschaften

Seit nunmehr 15 Jahren führt das NRZ eine Testung auf Suszeptibilität gegenüber einer Auswahl an Antibiotika (Ampicillin, Amikacin, Clindamycin, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Erythromycin, Fosfomycin, Gentamycin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Meropenem, Streptomycin, Tetrazyklin) durch. Dies dient ausschließlich der Analyse der Resistenzentwicklung. Hierbei wird auf die am häufigsten iden-

tifizierten *Campylobacter*-Spezies fokussiert. Von den eingesandten Proben wurden für die Resistenzauswertung 872 *C. jejuni* und 156 *C. coli* und damit insgesamt 1.028 Isolate berücksichtigt. 272 Isolate konnten nicht rekultiviert werden (ca. 19 %) oder stellten eine andere *Campylobacter*-Spezies dar (ca. 1%). [Abbildung 4](#) zeigt die jeweiligen Verteilungen der Resistenzen für *C. jejuni* und *C. coli*.

Bei *C. jejuni* betrug der Anteil der vollständig sensiblen Isolate 22 %, d. h. im Umkehrschluss, dass vier von fünf Isolaten gegenüber mindestens einem Antibiotikum resistent waren. Die europäischen Daten des ECDC zu Humanisolaten zeigen einen etwas höheren Anteil an suszeptiblen *C. jejuni* (35%).⁷ Jedes dritte der 872 *C. jejuni*-Isolate (35 %) war resistent gegenüber mindestens drei Antibiotikaklassen (s. [Abb. 4](#), oben). Die Einfachresistenz gegenüber Nalidixinsäure, einem Antibiotikum der Klasse der Chinolone, mit knapp 14 % der 872 Isolate wurde in unseren Proben am häufigsten detektiert. Die Gesamtresistenz für Nalidixinsäure in jeglicher Antibiotikakombination lag bei 71 % und für

das verwandte Fluorchinolon Ciprofloxacin ebenfalls bei >70 %. Von allen Resistenzen war die Vierfachresistenz gegenüber Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin und Nalidixinsäure mit 12 % am zweithäufigsten. In den Vorjahren, basierend auf der Testung von Isolaten hauptsächlich nur aus einem NRZ-Partnerlabor in Niedersachsen, war der Anteil an vollständig sensiblen *C. jejuni*-Isolaten deutlich geringer (<10 %) als im Jahr 2020.¹¹ Schaut man sich zur besseren Vergleichbarkeit nur die Isolate aus Niedersachsen für 2020 an, so beträgt der Anteil an sensiblen Isolaten in dieser Gruppe ca. 21 % und liegt somit in der Größenordnung der gesamtdeutschen Daten für 2020. Im Vergleich zu den Vorjahren ist der Anteil an sensiblen Isolaten gestiegen. Dieser Trend sollte weiterhin beobachtet werden.

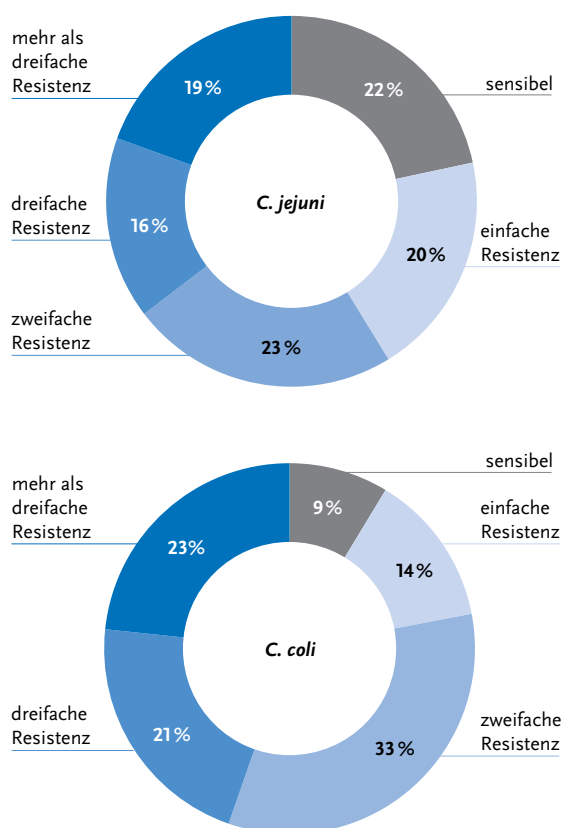


Abb. 4 | Prozentualer Anteil vollständig sensibler und resistenter (gegenüber 1, 2, 3 oder >3 der getesteten Antibiotikaklassen) *C. jejuni* (oben, insgesamt 872 Isolate getestet) und *C. coli* (unten, insgesamt 156 Isolate getestet).

Bei *C. coli* war die Lage hinsichtlich der Resistenz noch eindrucksvoller (s. Abb. 4, unten). Hier waren nur 9 % der insgesamt 156 berücksichtigten Humanisolate vollständig sensibel gegenüber unserem Antibiotika-Panel, was mit den europäischen Daten übereinstimmt.⁷ In den Vorjahren lag der Anteil sensibler *C. coli*-Isolate in unserem Labor bei ca. 2 %; im Vergleich dazu lag der Anteil sensibler *C. coli* aus Niedersachsen im Jahr 2020 bei knapp 4 %.¹¹ Bei *C. coli* waren die Doppelresistenzen gegenüber Streptomycin und Nalidixinsäure (12 %), dicht gefolgt von Ampicillin und Nalidixinsäure (10 %), am häufigsten.

3.4 Phylogenie

Aus der Genomsequenzierung konnte für die Isolate aus 2020 ein Überblick über die Vielfalt der in Deutschland vorkommenden Erregertypen (Phylogenie) und die Darstellung von potenziell zusammenhängenden Infektionsereignissen (Clusterdetektion) gewonnen werden. Unsere Analyse zeigte, dass die Einsender eine sehr diverse *Campylobacter*-Population eingesandt haben. Insgesamt repräsentieren die *C. jejuni*- und *C. coli*-Isolate aus 2020 mindestens 160 verschiedene MLST-Sequenztypen (MLST – Multi-Locus-Sequenztypisierung). Innerhalb dieser Kerngenom-MLST-Cluster fanden sich mehrere, die durch eine größere Anzahl repräsentiert wurden, was wiederum unter Umständen auf eine gemeinsame Infektionsquelle zurückgeführt werden könnte. [Abbildung 5](#) zeigt *C. jejuni*-Isolate, die zu Kerngenom-MLST-Clustern mit mindestens 10 Isolaten gehören. Aktuell sind neun solcher *C. jejuni*-Cluster zu verzeichnen, die aus Isolaten des Jahres 2020 bestehen und überregional verbreitet sind. Die Anzahl der Cluster (mindestens 10 Isolate) erhöht sich auf 14, wenn man Isolate aus den Vorjahren miteinbezieht. Einige von diesen Clustern wachsen stetig weiter. Das Cluster des ST-7355 (ST – Sequenztyp) mit derzeit 71 Isolaten ist aktuell das größte genetische Cluster und wahrscheinlich auf den Verzehr von Hühnerfleisch zurückzuführen, was ein Vergleich mit einer Sequenz von einem Hähnchenfleischisolat sowie international detektierten Mustersequenzen nahelegt. Bisher war es nur möglich Ausbrüche zu erfassen, die im engen epidemiologischen und regionalen Zusammenhang standen, z. B. in Gemeinschaftseinrichtungen. So umfasste im Jahr 2019 der größte gemel-

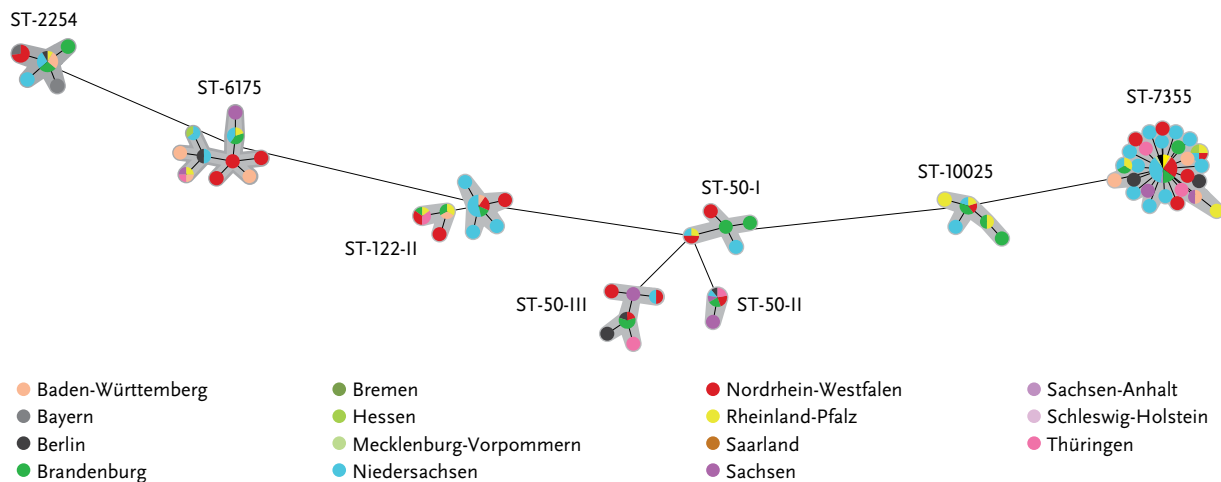


Abb. 5 | Minimal spanning tree basierend auf Kerngenom-MLST (637 Loci) von genetischen Clustern aus mindestens 10 *C. jejuni*-Isolaten aus dem Jahr 2020. Farben kennzeichnen das Bundesland des einsendenden Labors. Die Clusternamen beinhalten den MLST Sequenztyp. (MLST – Multi-Locus-Sequenztypisierung)

dete Ausbruch 22 Fälle.⁸ Auch wenn man genetische Cluster nicht automatisch mit Ausbrüchen gleichsetzen kann, da dafür eine epidemiologische Metaanalyse notwendig ist, wird doch deutlich, dass die molekulare Surveillance auch bei der *Campylobacter*-erkrankung ein wichtiges Instrument der Ausbruchsdetektion ist. Die epidemiologischen Ermittlungen zu diesen Clustern erfolgen nun in enger Zusammenarbeit mit Fachgebiet 35 des RKI (Abteilung Infektionsepidemiologie) und dem Bundesinstitut für Risikobewertung (Nationales Referenzlabor (NRL) *Campylobacter*). Zu *C. coli* haben wir aktuell keine größeren Cluster aus den Jahren 2019/2020 erfasst.

4. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zahl der Einsendungen durch die Intensivierung der molekularen Surveillance von *Campylobacter* im Vergleich zu den Vorjahren um mehr als das Dreifache erhöht werden konnte. Die Einsendungen decken derzeit den mittleren Teil Deutschlands, der mit Nordrhein-Westfalen auch das Bundesland mit dem größten Anteil der Meldedefälle enthält, sehr gut ab. Der Anteil von Proben aus den nördlichen und südlichen Bundesländern soll zum Zweck einer guten Repräsentativität weiter ausgebaut werden. Die Bedeutung einer Resistenztestung zur Überwa-

chung der Resistenzlage im Sinne der Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie-(DART-)Initiative der Bundesregierung kann auch für *Campylobacter* aus unseren vorliegenden Daten unterstrichen werden. Hier war besonders der hohe Anteil an Chinolon- und Fluorchinolon-Resistenzen auffällig, welche sowohl für *C. jejuni* als auch *C. coli* bei >70% lagen. Die eingesandten *Campylobacter*-Isolate wiesen eine hohe genetische Vielfalt auf und repräsentierten mindestens 160 unterschiedliche MLST-Sequenztypen. Aktuell wurden 9 genetische *C. jejuni*-Cluster mit mehr als 10 Isolaten detektiert, die hauptsächlich aus Isolaten des Jahres 2020 bestehen.

5. Fazit und Ausblick

Der Aufbau einer genom-basierten *Campylobacter*-Surveillance mit Abdeckung wichtiger Bundesländer ist gelungen und soll hinsichtlich der Repräsentativität insbesondere von Laboren aus Nord- und Süddeutschland in Zukunft weiter ausgebaut werden. Erfolgreich wurden bereits mehrere größere Infektionscluster aus >10 Isolaten detektiert und diese unterliegen der weiteren Beobachtung. Unsere Netzwerkpartner bitten wir, ihre *Campylobacter*-Isolate in ähnlicher Zahl an das NRZ weiter einzusenden und Labore aus Bayern, Hessen, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern werden um Unterstützung durch vermehrte Einsendungen gebeten.

Literatur

- 1 EFSA, ECDC (2021): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report, EFSA J, 19 (2), e06406.
- 2 Rosner, B. M., et al. (2017): A combined case-control and molecular source attribution study of human *Campylobacter* infections in Germany, 2011–2014, Sci Rep, 7 (1), 5139.
- 3 Ajene, A. N., Fischer Walker, C. L., and Black, R. E. (2013): Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, salmonella and *Shigella*-associated reactive arthritis, J Health Popul Nutr, 31 (3), 299-307.
- 4 Stefan Hagel, Hans-Jörg Epple, Gerhard E. Feurle, et al. (2015): S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple, Z Gastroenterol, 53, 418-59.
- 5 Willison, H. J., Jacobs, B. C., and van Doorn, P. A. (2016): Guillain-Barre syndrome, Lancet, 388 (10045), 717-27.
- 6 Lubbert, C. (2016): Antimicrobial therapy of acute diarrhoea: a clinical review, Expert Review of Anti-Infective Therapy, 14 (2), 193-206.
- 7 European Food Safety, A., P. European Centre for Disease, and Control, The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. EFSA J, 2021. 19(4): p. e06490.
- 8 RKI (2019): [Infektionsepidemiologisches Jahrbuch](#), Berlin.
- 9 Buchholz U, Buda S, Prahm K (2020): [Abrupter Rückgang der Raten an Atemwegserkrankungen in der deutschen Bevölkerung](#), Epid Bull 2020;16:7-9.
- 10 Fruth, A. et al. (2021): Auswirkungen der COVID-19-Pandemie auf die Häufigkeit an Erkrankungen durch darmpathogene bakterielle Erreger in Deutschland, 2020, Epid Bull im Druck.
- 11 BVL (2016): GERMAP 2015 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland, Antiinfectives Intelligence. Online verfügbar unter: <https://www.p-e-g.org/files/content/Ueber%20uns/GERMAP/GERMAP-2015deutsch.pdf> (zuletzt abgerufen am 06.07.2021).

Autorinnen

Dr. Sangeeta Banerji | Dr. Angelika Fruth | Prof. Dr. Antje Flieger

RKI, Abt. 1 Infektionskrankheiten, FG 11 Bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen

Korrespondenz: BanerjiS@rki.de

Vorgeschlagene Zitierweise

Banerji S, Fruth A, Flieger A: Intensivierte genom-basierte Surveillance von *Campylobacter*-Isolaten humaner Erkrankungsfälle in Deutschland

Epid Bull 2021;33:47-53 | DOI 10.25646/8838

Interessenkonflikt

Alle Autorinnen geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Danksagung

Wir bedanken uns bei allen Laboren, die das Netzwerk mit der Einsendung von *Campylobacter*-Isolaten unterstützen. Zudem gilt unser Dank unseren Kolleginnen und Kollegen der Infektionsepidemiologie (FG 35), der Sequenzierungseinheit MF2 und der Bioinformatik MF1 am RKI sowie dem NRL *Campylobacter* am BfR.