

**SCHLUSSBERICHT für das Vorhaben:  
FBI-ZOO - Food-borne infections of humans (FKZ 01KI07126)**

**IP07 (Prof. Dr. S. Suerbaum, MHH) – Multilokus-Sequenzanalyse von *Campylobacter* spp. aus Patientenproben, sowie von Tieren, Umwelt- und Lebensmittelproben**

**IP08 (Prof. Dr. C. Josenhans, MHH) – Determinanten der Wirtsspezifität und des Gewebstropismus von *Campylobacter*-Isolaten aus Patienten und Tieren**

**Laufzeit des Vorhabens: 1.10.2007 – 28.2.2011**

**I. Aufgabenstellung, Ausgangssituation, Planung und Durchführung und Zusammenarbeit**

Trotz der großen Bedeutung von *Campylobacter* sp. als häufigster gemeldeter bakterieller Durchfallerreger in Deutschland sind zentrale Fragen seiner Epidemiologie in Deutschland und der Pathogenese nicht gelöst. Es gab zu Beginn des Projekts keine Informationen über die Verteilung von MLST-Sequenztypen bei Nutztieren, Lebensmitteln und bei Patienten in Deutschland. Ebenso war unklar, wie sich *Campylobacter*-Isolate von Tieren, Menschen und aus Lebensmitteln voneinander unterscheiden. Das Projekt IP07 hatte als Hauptaufgaben die Sammlung frischer Patientenisolat von *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter* und EHEC (Klinikstudie), die Charakterisierung von *Campylobacter*-Isolaten aus der Klinikstudie sowie von Tieren und Lebensmitteln mittels MLST und die Nachwuchsförderung. Das Projekt IP08 verfolgte das Ziel, ausgewählte Isolate von *Campylobacter* sp. aus verschiedenen Quellen mit genetischen und phänotypischen Analysen zu untersuchen und mögliche Ursachen für die unterschiedliche Pathogenität in verschiedenen Wirten sowie Grundlagen von Wirts- und Gewebetropismus zu identifizieren. Beide Teilvorhaben (IP07 und IP08) wurden in enger Kooperation miteinander sowie mit mehreren anderen Teilprojekten (IP) des FBI-Zoo-Netzwerks und dem Bundesinstitut für Risikobewertung als weiterem Kooperationspartner durchgeführt. Geringe Verzögerungen durch Personalwechsel konnten durch eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung kompensiert werden, so dass alle Ziele der Projekte erreicht werden konnten.

**II. Erzielte Ergebnisse**

**Ergebnisse/Erfolge aus IP07 (Zusammenfassung):**

Eine Stammsammlung von > 500 Isolaten von *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* aus Mensch, Tier und Lebensmitteln (verschiedene geographische Lokalisationen in Deutschland) konnte im Zeitraum des Förderprogramms erstellt und durch verschiedene molekulare Methoden (teils in Kooperation mit anderen Mitgliedern des Förderprogramms) typisiert werden. Eine Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Isolaten aus Mensch, Tier und Lebensmitteln wurde übergreifend ermöglicht. So konnten bisherige Hypothesen der Hauptübertragungswege von *Campylobacter*-Spezies auf den Menschen indirekt bestätigt werden (IP07). Datenbanken und Datenbankeinträge zur übergreifenden Nutzung der Typisierungsergebnisse wurden in Kooperation mit anderen Mitgliedern des Netzwerks erstellt.

Im Einzelnen konnten alle folgenden Aufgaben (siehe ursprüngliches Arbeitsprogramm) erfolgreich bearbeitet werden:

#### Ziel 1:

Während der Laufzeit des FBI-Zoo-Projekts (1.10.2007-28.2.2011) wurden im Rahmen der „Klinikstudie“ an der MHH 12036 Stuhlproben von Patienten auf Salmonellen, Campylobacter und Yersinien sowie 560 Stuhlproben auf EHEC untersucht. Dies führte zur Isolierung von 80 Salmonellen (28 *S. Enteritidis*, 37 *S. Typhimurium* und 15 weitere Isolate verschiedener anderer Serovare), 37 *Campylobacter jejuni*, 8 *Campylobacter coli*, 7 Yersinien sowie 6 EHEC-Stämmen. Alle Stämme wurden archiviert und in das Seqsphere-Datenmanagementsystem eingepflegt und auf Anfrage an andere FBI-Zoo-Partner weitergeleitet. Für alle Stämme wurde der von Prof. Kreienbrock und seinem Team (IP13) entwickelte Fragebogen ausgefüllt.

#### Ziel 2:

Dieser Task (Testung eines von IFH-MS entwickelten Systems zur immunmagnetischen Separation von *Campylobacter* sp.) wurde zugunsten der anderen Tasks zurückgestellt, da die IMS-Entwicklung am IFH-MS zunächst wegen der dringlicheren diagnostischen Problematik auf EHEC konzentriert wurde und das System für *Campylobacter* noch nicht zur Verfügung stand.

#### Ziel 3:

Die von uns im Rahmen des FBI-Zoo-Projekts generierte FBI-Zoo-Campylobacter-Sammlung umfasst zur Zeit 510 *Campylobacter*-Isolate, von denen 464 Stämme im Zeitraum 2006-2010 isoliert wurden, bei den übrigen Stämmen handelt es sich um Referenzstämme und vorcharakterisierte Isolate, für die bereits Informationen vorliegen. 127 *Campylobacter*-Stämme wurden von Patienten aus den drei Zentren der Klinikstudie (MHH-H, IFH-MS und MVP-M) isoliert. Die restlichen Isolate stammen vorwiegend von Schweinen, Geflügel und anderen Tieren (205 Stämme) sowie von Lebensmittelproben (129 Stämme). Die überwiegende Zahl von Nicht-Patienten-Isolaten wurden von Prof. Alter (vorher BfR, jetzt ILH-B), Prof. Gerlach/Dr. Grüning (TiHo-IM) sowie Frau Dr. von Altröck (Klinik für kleine Klauentiere der TiHo und Frau Dr. Merle (TiHo-EPI) zur Verfügung gestellt.

Zum Zeitpunkt dieses Berichts wurde die MLST-Typsierung mittels des Oxford-Schemas (7 Allele, *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, and *uncA*, Gesamtlänge des Haplotyps 3309 bp) für alle 510 Isolate komplett abgeschlossen. Für die Sequenzauswertung wurde das im Rahmen des FBI-Zoo-Netzwerks zur Verfügung gestellte Programm Seqsphere eingesetzt, das sich auch im Vergleich mit anderer bisher im Labor eingesetzter Software für diesen Zweck als sehr leistungsfähig erwiesen und die Untersuchungen stark unterstützt hat. Im Rahmen eines Besuchs von Prof. Harmsen (INF-MS), Dr. Mellmann (IFH-MS) und eines Mitarbeiters der Firma Ridom wurde für die *Campylobacter*-MLST ein spezifisches „Template“ erzeugt, das die Auswertung der *Campylobacter*-MLST-Daten partiell automatisiert. Weitere Analysen wurden mit der Software Bionumerics (Applied Maths) durchgeführt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der MLST-Analyse der 464 im Zeitraum von 2006-2010 isolierten Stämme kurz zusammengefasst: Die 464 vollständigen MLST-Profile stammen von 172 *C. coli* und 285 *C. jejuni*-Stämmen. Die Profile umfassen 196 unterschiedliche STs, von denen 57 noch unbekannt (d.h. nicht in der Pubmlst-Datenbank vorhanden) waren. Diese neuen STs umfassen 37 neue Kombinationen bereits bekannter Allele, sowie 19 neue Allelsequenzen, die in 20 verschiedenen neuen STs vorkamen. Die ST-Verteilung war hochgradig divers: 122 STs wurden nur bei einem einzelnen Stamm gefunden, und die 10 häufigsten STs (ST50: 34 Isolate; ST21: 26; ST854: 15; ST45: 12; ST572: 12; ST1117: 11; ST48: 9; ST1073: 8;

ST61: 7; ST257; 7). umfassten zusammen nur 30,4% der Isolate. Von den 74 STs, die mehr als einmal gefunden wurden, waren 22 sowohl bei Stämmen von Patienten als auch bei Stämmen von Tieren und/oder Lebensmitteln repräsentiert, was ein flexibles Wirtsspektrum und ein zoonotisches Potenzial impliziert.

Die in Deutschland am häufigsten vertretenen STs gehören auch in anderen europäischen Ländern, die umfangreiche MLST-Untersuchungen durchgeführt haben (vor allem England), zu den dominanten Klonen. Fünf der 10 in Deutschland häufigsten STs gehören auch in England zu dieser Gruppe (ST45, ST21, ST257, ST854, ST61). Auch wenn die Aussagekraft solcher Vergleiche aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns eingeschränkt ist, haben wir keine Hinweise auf nationale Besonderheiten der MLST-Verteilung in unserer Sammlung erhalten.

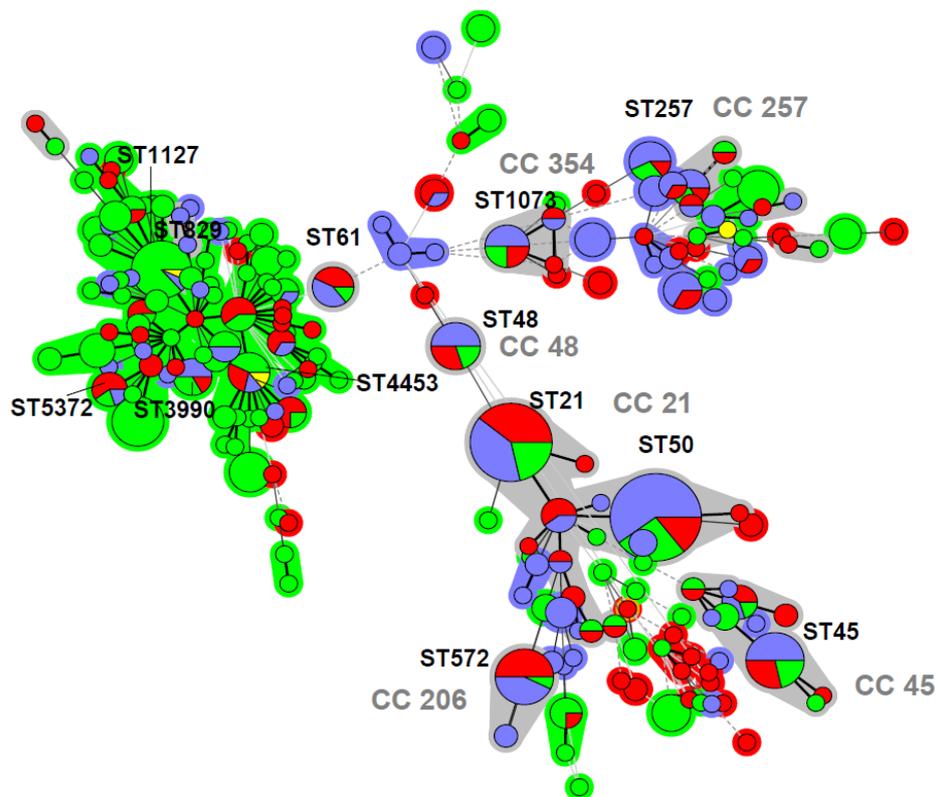


Abb. 1: Minimal-Spanning-Tree aufgrund der MLST-Ergebnisse für 464 FBI-Zoo-Isolate von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*. Die Größe der Kreise repräsentiert die Zahl der für einen Sequenztyp (ST) nachgewiesenen Isolate. Die Einfärbung der Kreise entspricht der Herkunft der Stämme aus Untersuchungsmaterial von Tier (grün), Mensch (blau) oder Lebensmitteln (rot). Klonale Komplexe eng verwandter Stämme sind mit grauer Schattierung umgeben. Die Zahl innerhalb der Kreise gibt die ST-Nummer an. Die *C. coli*-Isolate bilden einen eng zusammenhängenden Komplex (links oben), während sich *C. jejuni* als ein lockerer Verband von klonalen Komplexen darstellt (ST61 und rechts davon).

#### Ziel 4:

Frau Dipl.-Biol. Eugenia Gripp (Doktorandin im TP08) wurde intensiv in die Analyse der MLST-Daten eingebunden, Prof. Suerbaum fungiert als ihr Ko-Supervisor. Es bestand im Rahmen des Internationalen Graduiertenkollegs IRTG1273 (MHH, HZI und Karolinska Institutet Stockholm) ein intensiver Methoden- und Ergebnisaustausch über Fragen der Populationsgenetik gastrointestinalpathogener Erreger, insbesondere mit dem Teil der Arbeitsgruppe, der sich mit MLST-Analysen an *H. pylori* befasst. Die Ergebnisse des Projekts wurden mehrfach im Arbeitsgruppenmeeting sowie den Workshops des FBI-Zoo-Projekts diskutiert und waren somit Bestandteil von Maßnahmen zur Weiterbildung junger Wissenschaftler.

### **Ergebnisse/Erfolge aus IP08 (Zusammenfassung):**

In IP08 konnte das gewünschte Gesamtziel erreicht werden, das Ausmaß der wirtsspezifischen Anpassung und wirtsspezifischer Kolonisierungs- und Virulenzfaktoren von *Campylobacter*-Spezies und Varianten (Subtypen) besser abzuschätzen und zu charakterisieren. In phylogenetisch eng verwandten Stämmen war das Ausmaß der genetischen Heterogenität (vor allem der Makrodiversität, d.h. stammspezifische Gene) sehr gering. Es konnten keine wirtsspezifischen Gene oder Genvarianten identifiziert werden. Die Mikrodiversität bzw. Gendiversität einzelner Gene im Vergleich zwischen verschiedenen Stämmen aus unterschiedlichen Quellen stellte sich als etwas höher heraus. Dabei kristallisierte sich insgesamt heraus, dass die Anpassung an die Quelle der Infektion (domestiziertes Nutztier, Mensch, oder Lebensmittel) entgegen der bisherigen Vorstellungen in der Literatur mit großer Wahrscheinlichkeit bei den meisten häufigen *Campylobacter*-Stämmen (vor allem *C. jejuni*) sehr flexibel und reversibel ist, was eine flexible Anpassung an verschiedenste Umwelt- und animale Nischen ermöglicht. Die meisten *Campylobacter*-Stämme können also als Generalisten gelten.

Im Einzelnen konnten alle folgenden Aufgaben (siehe ursprüngliches Arbeitsprogramm) erfolgreich bearbeitet werden:

Ziel 1: "Pathotypisierung" ausgewählter *Campylobacter*-Isolate aus dem Menschen, aus Tieren, Lebensmitteln und Umwelt

*Campylobacter*-Stämme sind im Vergleich zu anderen intestinalpathogenen Bakterien sehr variabel und können sich schnell durch Mutation und Rekombination verändern, was vermutlich eine Anpassung an seine Nische im Intestinaltrakt von Mensch und Tier darstellt. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Anpassung irreversibel und primär an spezifische Wirte erfolgt oder ob die Anpassung eher flexibel und reversibel ist und an individuelle Umweltverhältnisse erfolgen kann. Ebenfalls sollte untersucht werden, wie bestimmte Gene, die mit Anpassung und Virulenz der Stämme in Verbindung gebracht worden waren, in verschiedenen Subtypen von *Campylobacter* (haupts. *C. jejuni*) verteilt sind.

Gemeinsam mit IP07 (Prof. Suerbaum, MHH-H, s.o.) wurde zunächst die MLST-Typisierung von über 500 gesammelten *Campylobacter*-Stämmen (*C. coli* und *C. jejuni*) durchgeführt und ausgewertet.

Anschließend wurden aus allen typisierten Stämmen aufgrund ihrer Diversität, Zugehörigkeit zu verschiedenen MLST-Sequenztypen und Isolierungsquelle 91 *C. jejuni*-Stämme ausgewählt. Diese 91 Stämme enthalten die in der FBI-Zoo-Sammlung dominanten Sequenztypen, und davon mindestens je ein Isolat aus Mensch, Tier und Lebensmittel. Ebenfalls wurden dieser Untergruppe von 91 Stämmen einige Isolate seltener Sequenztypen zugefügt, und ebenfalls möglichst gleich verteilt aus verschiedenen Isolierungsquellen, um eine Breite von Quellen und Sequenztypen zu repräsentieren.

Die Anwesenheit und Sequenzvariabilität ausgewählter Virulenzgene (siehe Tabelle 1) wurde dann bei allen 91 Stämmen durch PCR mit spezifischen Primern überprüft.

strains	sources	groups	Cj977	CjFspA1	CjFspA2	CjFlaC	CjFla4	CjneuC1	CjCadF	CjcdtB	CjCiaB	CjppiB	Cjggt	CjansB	CjansBs	CjflpA	1303+1307	Cjtlp7	Cjdtlp7
A 588																	2		
xy 259	human																1		
RB 922																	2		
RB 923	broiler																2		
6399	milk																2		
04410																			
04293																	2		
04299	human																2		
04438																	2		
04448																	2		
7255	poultry	gr 1															2		
7345	meat	ST 21															2		
7731																	2		
7732																	2		
7928																	1		
6660	milk																2		
6661																	2		
6278																	2		
7239																	2		
6812	duck																2		
6917	lamb																2		
04197	bovine																2		
04199																	2		
0222	human	gr 2															1		
RB 1008	broiler	ST 257															1		
6225	dove																		
7321	poultry	gr 3																	
A 396	human	ST 267																	
02557	human																		
6672	poultry	gr 4																	
04347	animal	ST 290																	
4834	poultry																1		
6323	dog	gr 5																	
6345	budgie	ST 45																	
xy 897	human																		
xy 904																	1		
Ring 267	human																2		
6797	poultry																2		
4337	chicken	gr 6															2		
6348	dog	ST 48																	
RB 957	broiler																2		
02562																			
xy 898	human	gr 7															2		
A 319		ST 50																	
04195	bovine																		
6823	poultry																		
RB 960	broiler																1		
A 412	human	gr 8															1		
7336	poultry	ST 51															1		
A 76																			
A 599	human	gr 9																	
7040	poultry	ST 572																	
7072	dog																		
02551	human	gr 10															1		
04331	chicken	ST 607																	

**Tabelle 1.:** Pathotypisierung-Schema von 55 *C. jejuni*-Stämmen die nach phylogenetischen Gruppen (Sequenztypen, STs) geordnet wurden. Jede Gruppe stellt einen ST dar und enthält mindestens einen Stamm vom Menschen, von Tieren und einen aus Lebensmitteln. Die Verteilung von vermuteten Virulenzgenen wurde durch PCR festgestellt. Farbkodierung: grün: Gen anwesend; rot: Gene abwesend; gelb: schwaches PCR-Produkt; weiß: nicht geprüft. Gene, die mit Sternchen markiert sind, wurden zusätzlich sequenziert, um die Sequenzdiversität festzustellen.

Unsere Hypothesen vor Beginn dieser Arbeiten waren, dass es uns mit Hilfe der Pathotypisierung gelingen könnte, 1) entweder neue Gene oder Kombinationen von Genen zu finden, die auf eine bestimmte Herkunft (oder wirtsspezifische Selektion) von Stämmen schließen lassen und vielleicht in Zukunft als wirtsspezifische Marker für ein Pathotypisierungsschema benutzt werden könnten, oder 2) dass die Gene eher nach phylogenetischer Herkunft verteilt sind und nicht primär auf die Isolierungsquelle rückschließen lassen. Von diesen beiden Möglichkeiten ist nun aufgrund unserer in FBI-Zoo erzielten Pathotypisierungsergebnisse die zweite jetzt die deutlich wahrscheinlichere. Diese Erkenntnis wird in Zukunft sehr wichtig sein, da sie die angestrebten Pathotypisierungsansätze in neue Richtungen lenken wird.

Weiterhin wurden einige Gene, die in allen Stämmen vorhanden waren, für einige aufgrund ihrer Herkunft und Sequenztyps ausgewählte Stämme sequenziert (Sternchen in Tabelle 1), um festzustellen, wie groß die Sequenzdiversität konservierter Gene zwischen den einzelnen Stämmen ist. Es wurde je nach Gen ein unterschiedlicher Grad von Sequenzdiversität gefunden, der mit dem phylogenetischen MLST-Typ der Stämme oft korrelierte, jedoch keine Korrelation mit der jeweiligen Isolierungsquelle oder dem jeweiligen Wirtstier aufwies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit diesem Ansatz kein Hinweis auf wirtsspezifische Gene oder Genvarianten gefunden werden konnte, was für den weiteren Entwurf von Typisierungsschemata für *Campylobacter*-Stämme aus Mensch und Tieren in Zukunft eine große Rolle spielen wird.

Ziel 2: *In vitro* Charakterisierung bakterieller phänotypischer Diversität von *Campylobacter*; Charakterisierung von Wirtsrezeptoren  
(phänotypische Diversität potenzieller Anpassungsfaktoren)

Um Hinweise für phänotypische Unterschiede verschiedener *Campylobacter coli*- und *C. jejuni*-Isolate zu finden, wurden verschiedene phänotypische Untersuchungsmethoden angewandt: Getestet werden sollten die Fähigkeit zur Zellinteraktion mit Zellen verschiedener Wirtsspezies (Mensch, Rind, Huhn; Zellaktivierungsfähigkeit und Zelladhärenz), die metabolische Kapazität der Stämme (beispielhaft die Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Kohlenhydratquellen) und die Proteinprofile der Zellen. Für die Zelladhärenztests wurden lebende Bakterien mit verschiedenen Zelltypen (Mensch, Maus, Rind, Huhn) koinkubiert und dann in einem Hochdurchsatzverfahren die Adhärenzfähigkeiten verglichen. Für die Messung der Aktivierung von Zellen wurden Zelllinien verschiedener Herkunft (Mensch, Tier) ebenfalls für bestimmte Zeiträume mit *Campylobacter* koinkubiert und danach der Zytokingehalt in Zellüberständen gemessen. Zusätzlich wurden zur Quantifizierung von Zellaktivierung Luziferasereporterzellen (Mensch, Rind, Huhn) eingesetzt, mit denen NF- $\kappa$ B-Aktivierung über die Lichtproduktion gemessen werden kann. Diese Zellen wurden von Dr. Karsten Tedin (FBI-Zoo **IP11**) hergestellt und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. TLR5-Rezeptoren unterschiedlicher Wirtsspezies (Huhn, Schwein, Maus), die mögliche Zielstrukturen zur Erkennung von *Campylobacter*-Spezies darstellen, konnten kloniert und in Säugerzellen exprimiert werden. Die Reaktion unterschiedlicher TLR5 gegenüber verschiedenen *Campylobacter*-Stämmen (lebend und Stammlysate) war kaum variabel (vermutlich stellt dieser Rezeptor keine Quelle für Wirtsspezifität von *Campylobacter* dar).

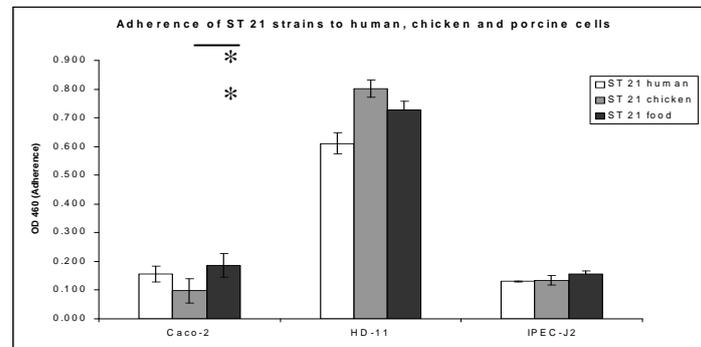
Die Proteinprofile wurden mit Hilfe von Western Blots mit *Campylobacter*-spezifischem Kaninchenserum und einem Hühnerserum aus einer *Campylobacter*-infizierten Legehenne getestet. Metabolische Kapazitäten wurden mit dem BioLog-Verfahren analysiert (96-Napf-Multiwell-Plattenformat, von denen jeder Napf ein unterschiedliches metabolisches Substrat enthält). Es wurde ein BioLog Plattentyp, PM1, ausgewählt, der 95 verschiedene Substrate, die zur Kohlenstoffgewinnung der Bakterien beitragen können, auslesen kann. Diese Platten wurden nach Bakterieninokulation für 30 h inkubiert und vollautomatisch alle 15 min mit Hilfe des OmniLog-Systems auf metabolische Aktivität ausgewertet.

Anfänglich wurden 12 *C. coli*- und *C. jejuni*-Stämme in diesen phänotypischen Tests verglichen, die nicht phylogenetisch miteinander verwandt sind (ausgewählt aufgrund ihrer Diversität und unterschiedlichen Herkunftsquelle).

Unterschiedliche nicht phylogenetisch verwandte *Campylobacter*-Stämme hatten unterschiedliche Fähigkeiten zur Zelladhärenz, Zellaktivierung und metabolischen Aktivität, wobei diese Fähigkeiten nicht mit der Herkunftsquelle zu korrelieren scheinen.

Weiterhin wurde eine Serie von 8 sehr nah miteinander verwandten *C. jejuni*-Stämmen verglichen, die alle dem ST21-Sequenztyp angehören, der sich in sehr vielen

Isolierungsquellen weltweit findet, und Tiere sowie den Menschen gut besiedeln kann. Sogar diese eng verwandten Stämme zeigten eine signifikante Diversität in ihrer Fähigkeit zur Zelladhärenz und Zellaktivierung. Ebenfalls zeigten sogar diese eng verwandten Stämme reproduzierbare und stabile Unterschiede in ihren Proteinprofilen und in ihren metabolischen Profilen. Auch dabei waren die phänotypischen Unterschiede nicht mit der Isolierungsquelle der Stämme zu korrelieren.



**Abb. 2: Phänotypische Unterschiede in der Adhärenz von drei ST21-*C. jejuni*-Stämmen aus dem Menschen, Huhn und Lebensmittel (Milch) an verschiedene Säugerzelllinien.** Humane Kolonepithelzellen (CaCo-2), Hühnermakrophagenartige Zellen (HD11) und intestinale Epithelzellen vom Schwein (IPEC-J2) wurden in Triplikaten infiziert mit Biotin-markierten Bakterien (MOI von 200) und für 1 h koinkubiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der Zahl adhärenter Bakterien eines Stamms. Statistische Unterschiede in der Adhärenz wurden durch Student's *t*-test evaluiert. Ein *p*-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet (\* *p* <= 0.05, \*\* *p* <= 0.01, \*\*\* *p* <= 0.001). h = human, ch = Huhn, f = Lebensmittel.

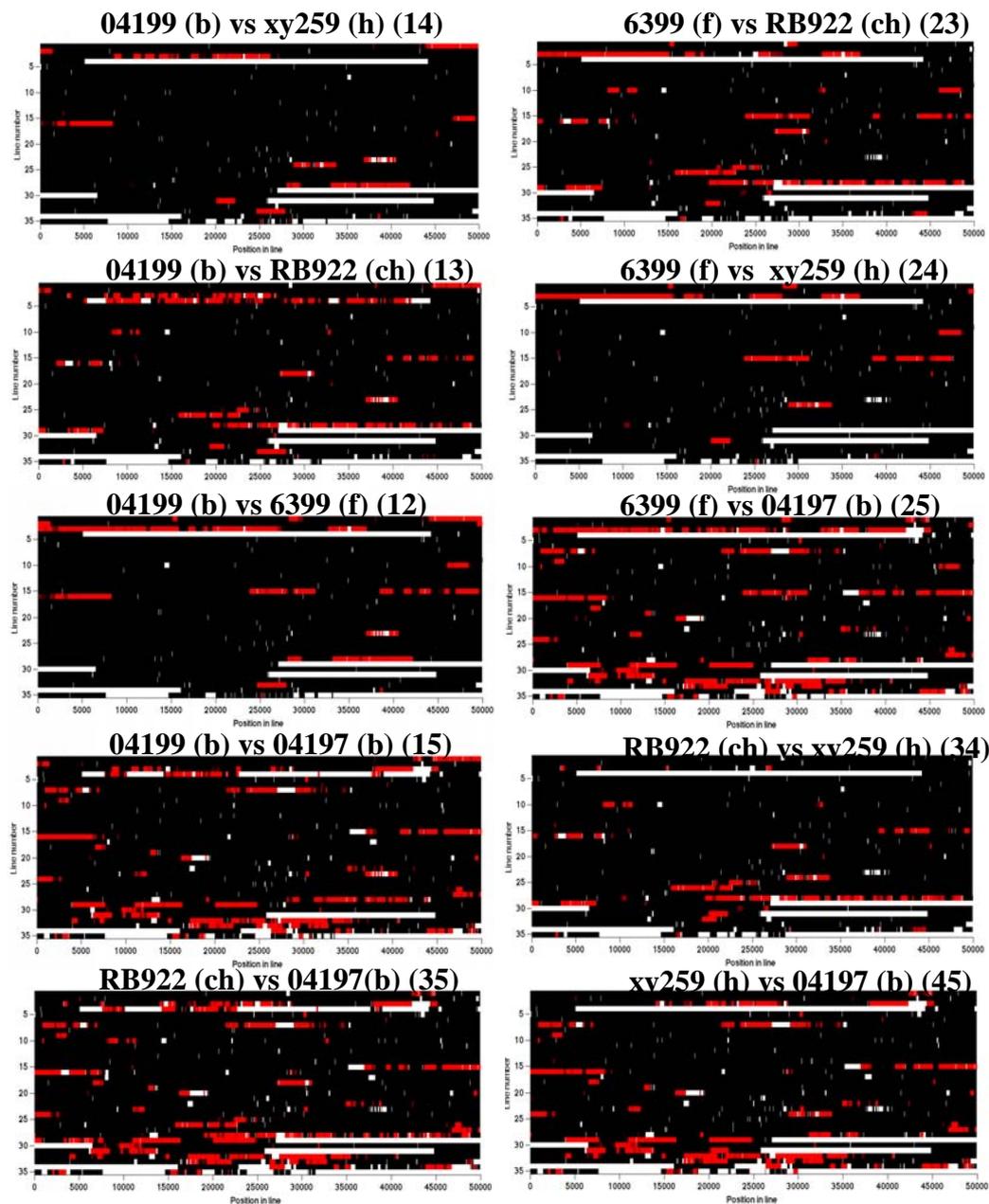
Da zu diesem Zeitpunkt Hochdurchsatzsequenzierung (454-Technologie) als Technologiefortschritt für Partner MHH-H zur Verfügung stand, wurden zur Klärung der Genomdiversität (als Grundlage für die phänotypische Variabilität) innerhalb der eng verwandten ST21 Stämme (*C. jejuni*) in Kooperation mit IP07 (Prof. Suerbaum, MHH-H) fünf vollständige Genome dieser *C. jejuni*-Variante ST21 aufgeklärt. Die fünf Genome wurden mit einer coverage von ungefähr 40-fach sequenziert, so dass man von einem quasi vollständigen Genom ausgehen kann. Sie wiesen eine ähnliche Länge von zwischen 1,6 und 1,8 Megabasenpaaren auf. Die Genome wurden mit den KODON- und MAUVE-Softwareprogrammen vollständig annotiert (Identifizierung kodierender Regionen) und miteinander verglichen. Ebenfalls wurden paarweise Vergleichskarten dieser Genome mit einem von einem externen Kooperationspartner, Xavier Didelot (Oxford), entwickelten Algorithmus (Bayes'sches Statistikmodell) erstellt (Abb. 2, siehe unten).

Die Genome zeigten insgesamt eine geringe Makrovariabilität (wenig stammspezifische und neuartige Gene), jedoch eine deutliche Mikrovariabilität (Sequenzvariabilität in kodierenden und nicht-kodierenden Genomregionen) zwischen diesen eng verwandten Stämmen. Stammspezifische Gene stellen sich fast ausschließlich als Bakteriophagen-Gene dar, die an der Genommodularität und vermutlich auch an der Bildung neuer pathogener Varianten von *C. jejuni* beteiligt sein können.

Um die phänotypische Variabilität dieser Stämme mit der gefundenen genotypischen Variabilität zu verbinden, wurde die Anwesenheit und Sequenzvariabilität zahlreicher Gene in verschiedenen eng verwandten und wenig verwandten Stämmen durch PCR und Sequenzierung geprüft. Dabei ergab sich jedoch bisher keine direkte Erklärung

für die gefundenen phänotypischen Unterschiede. Sie müssen in Zukunft noch näher untersucht werden. Es konnte keine Korrelation der Sequenzunterschiede dieser Stämme mit der Isolierungsquelle der Stämme identifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Genomanpassungen dieser Stämme vorwiegend unabhängig von der Wirtsspezies erfolgt sind.

Zusammenfassend ließ sich durch diese Untersuchungen eine große phänotypische und genotypische Diversität in *Campylobacter* (insbesondere in *C. jejuni*) feststellen, die sowohl in weniger eng verwandten als auch in eng verwandten Stämmen von *C. jejuni* vorlag und nicht mit der Isolierungsquelle und Herkunft der einzelnen Stämme in Verbindung gebracht werden konnte. Die von uns in FBI-Zoo erbrachten Daten stützen nun die Hypothese, dass die dominanten Sequenztypen von *C. jejuni* (wie z. B. ST21) überwiegend Generalisten sind, d. h. dass sie in der Lage sind, Mensch, Nutztier (und Lebensmittel tierischer Herkunft) gleichermaßen zu kolonisieren und sich immer wieder neu und vermutlich reversibel an unterschiedliche Umgebungsbedingungen anpassen zu können.



**Abb. 3: Paarweise Nukleotidvergleiche von fünf vollständigen ST21 *C. jejuni*-Genomen.** Die Vergleiche wurden mit Hilfe eines Bayes-statistischen Modells durchgeführt (Kennemann *et al.*, PloS Genetics 2011); schwarze Bereiche kennzeichnen identische Sequenzbereiche, weiße Abschnitte zeigen nicht vergleichbare (unverwandte oder fehlende) Sequenzbereiche an, rote Abschnitte zeigen ähnliche (importierte bzw. rekombinierte, jedoch nicht identische) Sequenzbereiche an (h = humanes Isolat; ch = Isolate vom Huhn; f = Isolate von Lebensmitteln; b = Isolate vom Rind). Die Intensität von Farbbereichen zeigt den Grad statistischer Verlässlichkeit. Eine horizontale Linie entspricht 50.000 Kilobasen der Genome.

Ziel 3: *In vivo*-Charakterisierung von *Campylobacter*-Faktoren, die möglicherweise Wirtsspezifität vermitteln können (Hühner- und Schweine-Infektionsmodelle)

Wir haben in Kooperation mit Prof. Gerlach und Dr. Grüning (TiHo-IM, IP12) versucht, ein Infektionsmodell für *Campylobacter* im Mini-Schwein aufzubauen. Dafür

wurde ein Infektionsversuch durchgeführt. Vermutlich aufgrund der variablen natürlichen Besiedlung dieser Tiere mit anderen *Campylobacter*- und *Arcobacter*-Spezies (diese wurde durch PCR und Kultur nachgewiesen) war die Kolonisierungsfähigkeit durch *C. jejuni* nicht reproduzierbar. Da dieses Modell zusätzlich sehr platzintensiv und arbeitsaufwändig ist, wurde daher von der weiteren Verwendung dieses Modells abgesehen.

In Kooperation mit Prof. Wieler und Dr. Tedin (beide IMT-B, IP10 und IP11) wurde erfolgreich ein Hühnerinfektionsmodell etabliert. In diesem Modell wurden 2-Wochen alte White Leghorn-Hühner mit  $5 \times 10^7$  Einheiten *C. jejuni* infiziert. Da die Tiere pathogen-frei geschlüpft und gezogen waren (SPF-Tiere) und daher frei von anderen *Campylobacter*-Stämmen waren, verlief die Infektion sehr reproduzierbar.

Es wurde daher ein weiterer Versuch zur Feststellung von Kolonisierungsfähigkeiten eng verwandter ST21-*C. jejuni*-Stämme aus verschiedenen Wirten durchgeführt. Dafür wurden die SPF-Hühner in Gruppen zu 5 Tieren jeweils mit einem ST21-Stamm aus dem Menschen (xy259) und einem ST21-Stamm aus dem Huhn (RB922) infiziert. Diese Stämme waren in Task 3 (IP08) genomsequenziert worden, es lagen also genaue Informationen zu den genetischen Unterschieden in den Gesamtgenomen zwischen Stamm xy259 und RB922 vor (siehe auch Abb. 2). Während des gesamten Infektionszeitraums wurden jeden zweiten oder dritten Tag Abstrichupfer aus der Kloake der Tiere entnommen, um die persistente Kolonisierung der Tiere zu verifizieren. Diese Tests verliefen bei allen Tieren über den gesamten Infektionszeitraum positiv. Nach zwei Wochen wurden die Tiere seziert und Proben des Intestinaltrakts (Caecum, Caecaltonsille und Colon) auf die Anwesenheit von *C. jejuni* untersucht. Es fanden sich in beiden Tiergruppen ähnliche Zahlen der infizierten *C. jejuni*-Stämme.

Zusammenfassend kann aus diesem Infektionsversuch festgestellt werden, dass eng verwandte *C. jejuni*-Stämme aus dem Menschen auch in der Lage sind, Hühner zu infizieren. Es hat also bei diesen eng-verwandten Stämmen trotz einiger Genomunterschiede keine irreversible und spezifische Wirtsanpassung stattgefunden, was ebenfalls die unter Task 3 genannte Hypothese des Vorkommens von *C. jejuni* als flexibler „Generalist“ mit Überlebensvorteil unter vielen Umgebungsbedingungen unterstützt.

Eine wissenschaftliche Publikation, die die oben angegebenen Ergebnisse der Tasks 1, 2 und 3 aus IP08 enthält und in Kooperation mit einigen anderen IPs (IP07, IP10, IP11, IP12) aus FBI-Zoo sowie externen Kooperationspartnern angefertigt wurde, steht kurz vor der Einreichung in einem „Peer-Review“ Journal:

Titel: “Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle”

Autoren: Eugenia Gripp, Daniela Hlahla, Friederike Kops, Karsten Tedin, Sven Maurischat, Thomas Alter, Kerstin Schreiber, Dietmar Schomburg, Traute Janssen, Dirk Hofreuter, Patrick Bartholomäus, Sabrina Woltemate, Markus Uhr, Birgit Brenneke, Petra Grüning, Gerald Gerlach, Lothar Wieler, Sebastian Suerbaum, Christine Josenhans.

#### Ziel 4:

Förderung junger Wissenschaftler: in enger Kooperation mit TP07 wurde eine Doktorandin, Frau Dipl.-Biol. Eugenia Gripp, im FBI-Zoo-Projekt IP08 ausgebildet. Der erste Teil ihrer Doktorarbeit befasste sich praktisch ausschließlich mit Fragestellungen im IP08-Projekt und ebenfalls in Kooperation mit IP07 mit Teilaspekten von IP07. Frau Gripp konnte so sehr intensiv in die relevanten Fragestellungen lebensmittelübertragener Darmpathogene eingearbeitet werden (Stammsammlungen, Auswahl der Stämme, phänotypische Tests, Genomanalysen). Eine Publikation aus IP08 und Teilaspekten von IP07, die Frau Gripp als Erstautorin zeichnen wird, steht kurz vor der Einreichung. Ebenfalls konnte Frau Gripp auf zahlreichen internen und externen wissenschaftlichen Veranstaltungen ihre Daten vorstellen und von den Weiterbildungsmöglichkeiten durch andere Wissenschaftler profitieren. Durch ihre gleichzeitige Teilnahme als assoziiertes Mitglied im Graduiertenprogramm IRTG1273 der Hannover Biomedical Research School konnte Frau Gripp außerdem in Projektpräsentationen (Poster und Vorträge), Präsentationen von Übersichtsartikeln und Journal Clubs den jungen wissenschaftlichen Kollegen ebenfalls einen Einblick in die aktuellen Belange der Zoonoseforschung bieten. Die bisherigen Ergebnisse aus ihrem Projekt wird sie auch im Sept. 2011 auf der weltgrößten internationalen Konferenz zum Thema *Campylobacter* (CHRO 2011) präsentieren (weitere wichtige Weiterbildungsmaßnahme junger Wissenschaftler). Ebenfalls wurde eine Master-Studentin (Sophie Borchert; Abschluss 2009) im Rahmen des Projekts ausgebildet. Der Blick für zoonotische-infektiologische Fragestellungen in der Umgebung der MHH (z. B. in der Exzellenz-Graduiertenschule HBRS der MHH) wird durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Gruppen im FBI-Zoo bei Nachwuchs und Mitarbeitern geschärft.

#### **V. Finanzen:**

Gegenüber der ursprünglichen Planung des Projekts wurde durch Verzögerungen der Personalrekrutierung eine Reihe von Umdispositionen und Mittelverschiebungen nötig, die sämtlich in Abstimmung mit dem DLR durchgeführt wurden. Keine dieser Verzögerungen hatte negative Auswirkungen auf den Erfolg des Gesamtprojekts. Die Bewilligung der von uns beantragten Mittelverschiebungen sowie der kostenneutralen Laufzeitverlängerung hat uns erlaubt, die oben genannten Ergebnisse zu erzielen.

#### **VI. Voraussichtlicher Nutzen:**

Nach wie vor sehen wir wichtige Verwertungsmöglichkeiten der Erkenntnisse im Bereich humane Diagnostik und Risikoabschätzung, die im Fortsetzungsprojekt weiterverfolgt werden. Keine Änderung der wissenschaftlichen und technischen Erfolgsaussichten sowie der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit.

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned shortly	2. type of document (e.g. report, publication) final report
3. title Food-borne zoonotic infections of humans (FBI-Zoo) IP07: Multilocus Sequence Analysis of Campylobacter sp. isolated from human, animal, environmental and food sources  IP08: Factors of host specificity of Campylobacter species from humans, animals and food	
4. author(s) (family name, first name(s)) Suerbaum, Sebastian (Prof. Dr.)  Josenhans, Christine (Prof. Dr.)	5. end of project 28.02.2011  6. publication date submission planned shortly  7. form of publication scientific journal (peer reviewed)
8. performing organization(s) (name, address)  Hannover Medical School Institute for Medical Microbiology and Hospital Epidemiology Carl-Neuberg-Strasse 1 30625 Hannover  IP07 and IP08: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum; Prof. Dr. Christine Josenhans	9. originator's report no. ----  10. reference no. 01 KI 07126  11. no. of pages report: 11 pages publication: approx. 12 pages in print
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 0  14. no. of tables 1  15. no. of figures 3
16. supplementary notes ----	
17. presented at (title, place, date) annual status seminar of project FBI-Zoo (in 2008, 2009, 2010) submitted for presentation at scientific conference in 2011: Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms, Vancouver, August/September 2011.	

18. abstract

IP07:

The enteropathogenic *Campylobacter* Species *C. jejuni* and *C. coli* are important intestinal pathogens of humans and are probably transmitted in most cases by the zoonotic and food route. Despite the huge importance of *Campylobacter* sp. in Germany as the dominant bacterial diarrheal pathogen we know very little so far on the epidemiology and population genetics of these species. Goals of this project was the collection, archiving and molecular charakterisation/typing of enteric *Campylobacter* isolates in Germany (from human patients, animals, the environment and from food). For molecular typing, multilocus sequence typing (MLST) should be primarily utilised.

Results: more than 500 enteric *Campylobacter* isolates were collected and archived from diverse human, animal, food etc. sources in different regions of Germany. In addition, collectively with other German clinical centres, fresh human isolates from patients were collected and assembled in the Seqsphere database. All strains were MLST-typed and tested for plasmid content. The MLST data from all strains are also submitted to the publicly accessible online database PubMLST.

As a conclusion, the results demonstrate that in Germany several large *Campylobacter* complexes, each one with high numbers of isolates, exist which circulate in humans, animals and food. Most of these phylogenetically related complexes are the same as the dominant complexes found in other European countries. In addition, some rarer and less numerous *Campylobacter* clones were found, whose origin and epidemiology are less clear to date. The results will significantly contribute to improving the typing and epidemiological assessment of *Campylobacter* world wide and to curbing the transmission from different animal and food sources to humans.

IP08:

The enteropathogenic *Campylobacter* Species *C. jejuni* and *C. coli* are important intestinal pathogens of humans and are probably transmitted in most cases by the zoonotic and food route. Despite the huge importance of *Campylobacter* sp. as one of the dominant bacterial diarrheal pathogens worldwide we know little about host specific factors of these species or their virulence factors.

Aims of this project were to identify and characterize novel factors of host colonization and possibly host specificity of *Campylobacter* species. This purpose was mainly addressed by the genetic, genomic and phenotypic characterization and comparison of closely related *Campylobacter jejuni* strains.

Results: virulence gene typing of highly variable genes was performed for over 100 of the *Campylobacter* strains archived in IP7. For this purpose, 18 variable virulence genes were amplified with specific primers from *C. jejuni* and *C. coli* strains and partially sequenced. Most of the putative virulence genes showed very little strain-to-strain variability. Several strongly strain variable or genes not present in all strains could be identified in *C. jejuni*. However these genes proved not to be source or host specific. In a second part of the project, five closely related *Campylobacter jejuni* strains were compared phenotypically and by whole genome sequencing. Host interaction, metabolic capacity, antigenic properties and surface glycosylation were variable among these strains, but were not associated to host or source.

The results show that *Campylobacter (jejuni)* is a human pathogenic bacterium possessing a high phenotypical flexibility, which allows the reversible adaptation to diverse hosts and habitats. These molecular tools will contribute to the improvements of virulence typing of *Campylobacter* isolates. The advanced knowledge concerning strain-to-strain variation will likewise enable an improved identification of the dominant human pathogenic *Campylobacter jejuni* subtypes and the assessment of their epidemiological properties. Furthermore, the genome wide characterisation of several closely related *Campylobacter jejuni* strains will allow to study in more detail the variable determinants of colonisation and in diverse hosts.

19. keywords

*Campylobacter*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, epidemiology of infectious disease ; food-borne zoonotic pathogen, host specific pathogen colonization, bacterial virulence factors

20. publisher

-----

21. price

--open access intended

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN Publikation in Kürze geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel IP07: Multi-Lokus-Sequenz-Analyse von Campylobacter-Spezies aus Mensch, Tier, Umwelt und Lebensmittel  IP08: Charakterisierung wirtsspezifischer Faktoren von Campylobacter-Spezies aus Mensch, Tier, Umwelt und Lebensmittel	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Suerbaum, Sebastian (Prof. Dr.)  Josenhans, Christine (Prof. Dr.)	5. Abschlussdatum des Vorhabens 28.02.2011  6. Veröffentlichungsdatum geplant/kurz vor der Einreichung  7. Form der Publikation wissenschaftliche Publikation (peer review)
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)  Medizinische Hochschule Hannover Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Carl-Neuberg-Strasse 1 IP07 und IP08: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum; Prof. Dr. Christine Josenhans	9. Ber. Nr. Durchführende Institution ---  10. Förderkennzeichen 01 KI 07126  11. Seitenzahl Bericht: 11 Seiten Publikation: ungefähr 12 Druckseiten
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 0  14. Tabellen 1  15. Abbildungen 3
16. Zusätzliche Angaben --	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) präsentiert bei jährlichen Statusseminaren des FBI-Zoo-Verbunds (2008, 2009, 2010) eingereicht zur Präsentation bei wissenschaftlichem Fachkongress 2011: Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Vancouver, September 2011 (CHRO2011)	

## 18. Kurzfassung

### IP07

Die enteropathogenen *Campylobacter*-Arten *C. jejuni* und *C. coli* sind wichtige intestinale Pathogene des Menschen und werden wahrscheinlich in den meisten Fällen zoonotisch übertragen. Trotz der großen Bedeutung von *Campylobacter* sp. in Deutschland als der am häufigsten isolierte bakterielle Durchfallserreger wissen wir bis heute extrem wenig über die Epidemiologie und Populationsgenetik dieser Spezies.

Die Zielsetzung des Vorhabens war die Sammlung, Archivierung und molekulare Charakterisierung/Typisierung von Enteritis-*Campylobacter*-Isolaten aus Deutschland (aus Mensch, Tier und Lebensmittel). Zur molekularen Typisierung sollte hauptsächlich die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) verwendet werden.

Ergebnisse: mehr als 500 Enteritis-*Campylobacter* aus verschiedenen Isolierungsquellen Mensch, Tier, Lebensmittel aus verschiedenen Regionen Deutschlands konnten gesammelt und archiviert werden. Ebenfalls wurden zusammen mit anderen deutschen Zentren humane Isolate aus Patienten gesammelt und in der SeqSphere-Datenbank niedergelegt. Alle Stämme wurden MLST-typisiert und nach Plasmidgehalt untersucht. Die MLST-Daten aller Stämme werden ebenfalls in der öffentlich online zugänglichen PubMLST-Datenbank abgelegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Deutschland einige *Campylobacter*-Komplexe mit einer großen Zahl eng verwandter Isolate in Mensch, Tier und Lebensmittel zirkulieren und zahlenmäßig überwiegen. Diese Komplexe entsprechen den zahlenmäßig stark vertretenen Gruppen/Komplexen von *Campylobacter*-Klonen in einigen anderen europäischen Ländern und weltweit. Ebenfalls sind einige weniger zahlreiche *Campylobacter*-Klone vorhanden, deren Herkunft und Epidemiologie weniger klar sind. Die Ergebnisse werden entscheidend dazu beitragen, die Typisierung und weltweite Epidemiologie von *Campylobacter* zu verbessern und die Übertragung von verschiedenen Isolierungsquellen auf den Menschen zu verringern.

### IP08:

Die enteropathogenen *Campylobacter*-Arten *C. jejuni* und *C. coli* sind wichtige intestinale Pathogene des Menschen und werden wahrscheinlich in den meisten Fällen zoonotisch übertragen. Trotz der großen Bedeutung von *Campylobacter* sp. unter den häufigsten bakteriellen Durchfallserregern weltweit wissen wir wenig über wirtsspezifische Faktoren und Virulenzfaktoren dieser Bakterien.

Die Zielsetzung dieses Vorhabens war, basierend auf der Stammsammlung aus IP07, neue Faktoren der Kolonisierung und möglichen Wirtsspezifität von *Campylobacter*-Spezies zu identifizieren und zu charakterisieren. Dieses Ziel wurde hauptsächlich durch die genetische, gesamtgenomische und phänotypische Charakterisierung eng verwandter *Campylobacter jejuni*-Isolate adressiert.

Ergebnisse: Eine Virulenzgenotypisierung besonders variabler Gene wurde von über 100 der in IP07 archivierten *Campylobacter*-Stämme durchgeführt. Dabei wurden 18 Virulenzgenkandidaten mit Hilfe von spezifischer PCR aus *C. jejuni*- und *C. coli*-Stämmen amplifiziert und teilweise sequenziert. Die meisten dieser vermuteten Virulenzgene waren sehr wenig stammvariabel. Mehrere stark stammvariable oder nicht in allen Stämmen vorhandene Gene konnten in *C. jejuni* identifiziert werden. Diese Gene waren jedoch nicht mit einer bestimmten Quelle oder einer Wirtsspezies assoziiert. In einem zweiten Teil wurden fünf eng verwandte *Campylobacter jejuni*-Stämme phänotypisch und durch Gesamtgenom-Analyse miteinander verglichen. Die Wirtsinteraktion, metabolische Kapazität, antigene Eigenschaften und Oberflächenglykosylierung dieser Stämme waren variabel. Die genomische Analyse zeigte geringe Variabilität dieser eng verwandten Stämme im Genominhalt, aber beträchtliche Variabilität in den Gensequenzen, die jedoch nicht mit einem bestimmten Wirt oder einer Quelle assoziiert waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *Campylobacter (jejuni)* um ein pathogenes Bakterium mit einer hohen phänotypischen Flexibilität handelt, das die reversible Anpassung an verschiedenste Wirte und Habitate erlaubt. Die molekularen Erkenntnisse werden zur besseren Virulenztypisierung von *Campylobacter*-Isolaten beitragen. Die Erkenntnisse werden ebenfalls eine bessere Identifizierung der dominanten humanpathogenen *Campylobacter jejuni*-Typen und Verfolgung Ihrer Epidemiologie ermöglichen. Weiterhin wird die genomweit erfolgte Charakterisierung mehrerer eng-verwandter *Campylobacter jejuni*-Stämme es erlauben, die variablen Determinanten während der Kolonisierung verschiedener Wirte in Zukunft genauer zu studieren.

## 19. Schlagwörter

*Campylobacter*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Epidemiologie, Lebensmittelübertragung von Pathogenen, wirtsspezifische Kolonisierung, bakterielle Virulenzfaktoren

## 20. Verlag

----

## 21. Preis

----open access beabsichtigt