



VBNC-*Campylobacter* in der Umwelt: Erkenntnisse aus Praxis und experimentellen Studien

Benjamin Reichelt¹, Kerstin Stingl², Vanessa Szott^{1,3}, Uwe Roesler¹, Anika Friese¹

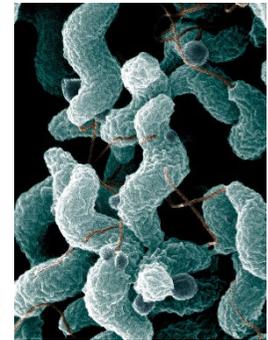
¹Institut für Tier- und Umwelthygiene, Tiermedizinisches Zentrum für Resistenzforschung & Zentrum für Infektionsmedizin, Freie Universität Berlin

²Bundesinstitut für Risikobewertung, Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*, Berlin

³Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Zentrum für Veterinary Public Health, Freie Universität Berlin

Hintergrund

- in 2021 Campylobakteriose häufigste gemeldete lebensmittelassoziierte Magen-Darm-Erkrankung beim Menschen in der EU
- Hühnerfleisch bedeutendste Infektionsquelle für *Campylobacter*-Enteritiden beim Menschen → vor allem *Campylobacter (C.) jejuni*
- 11,5% der Frischfleischproben vom Masthuhn in EU *Campylobacter*-positiv in 2021
- 16,4% der Halshautproben über Grenzwert (1000 KbE/g, gemäß VO (EG) Nr. 2073/2005) → 7,7% der Proben in Deutschland (Quelle: EU One Health Zoonosis Report 2021, Tabelle 6, Data from Food business operator)



Hintergrund

- Projekt „PAC-Campy:
„Prävention und Bekämpfung von *Campylobacter*-Infektionen:
Ein One-Health-Ansatz“; 2018-2021



- Teilprojekt: Ein- und Austrag von *Campylobacter* in Masthähnchenbetrieben und Vorkommen in der Umwelt

Hintergrund



Austrag aus dem Stall

Kolonisierung der Masthühner im Stall

Vorkommen in der Umwelt

Eintrag aus der Umwelt



Hintergrund

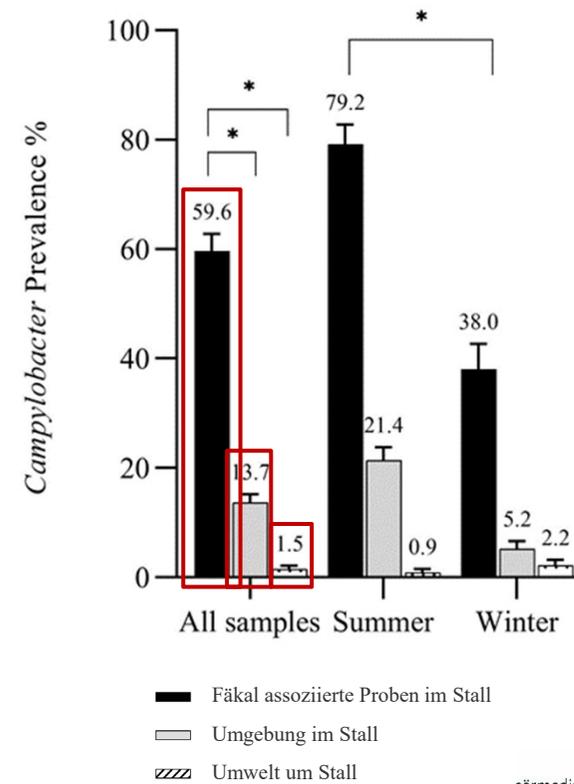
- fast alle Isolate *C. jejuni*, nur 4,8% *C. coli*
- Fäkal assoziierte Proben im Stall (Sammelkot, Sockentupfer, Mistmatte)

59.6% (136/228)
- Umgebung im Stall (Umgebungstupfer, Luft):

13.7% (73/532)
- Umwelt um Stall (Sockentupfer, Wasser, Umgebungstupfer, Luft):

1.5% (7/456) – 5 x Wasser, Sockentupfer, Gazetuper
- Umgebung im Stall nach Desinfektion (Umgebungstupfer):

0% (0/309)



Hintergrund

- wenige *C. jejuni* in Umwelt gefunden



Welche Rolle spielen VBNC-*Campylobacter* in Masthühnställen und deren Umgebung?

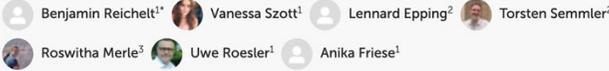
- **Projekt PAC-Campy II, 2021-2023:**

Experimentelle Tenazitätsstudien kultivierbarer *Campylobacter* sowie VBNC-*Campylobacter* unter verschiedenen Umweltbedingungen, Induktion des VBNC-Zustandes sowie Vorkommen in Praxis

ORIGINAL RESEARCH article
Front. Microbiol., 06 October 2022
Sec. Food Microbiology
Volume 13 - 2022 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982693>

This article is part of the Research Topic
Campylobacter-associated Food Safety
[View all 32 Articles >](#)

Transmission pathways of *campylobacter* spp. at broiler farms and their environment in Brandenburg, Germany

 Benjamin Reichelt^{1*} Vanessa Szott¹ Lennard Epping² Torsten Semmler²
Roswitha Merle³ Uwe Roesler¹ Anika Friese¹

¹ Department of Veterinary Medicine, Institute for Animal Hygiene and Environmental Health, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany
² Genome Sequencing and Genomic Epidemiology, Robert Koch Institute, Berlin, Germany
³ Department of Veterinary Medicine, Institute for Veterinary Epidemiology and Biostatistics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

Viable but non culturable *Campylobacter*

- Bedeutung von nicht kultivierbaren *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln (Fleisch, Milch, Eischale) wird diskutiert
- gut etablierte Methode zur Quantifizierung von VBNC-*Campylobacter* spp. mit viability(v)-qPCR für spezifische Matrices (Stingl et al. 2021, Petersen et al. 2021)
- VBNC-*Campylobacter* können aufgeweckt werden und wieder in den kultivierbaren Zustand übergehen (Wulsten et al. 2020)



Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses

Kerstin Stingl¹, A. Inke F. Wulsten¹, Inke F. Wulsten¹, Imke F. Wulsten¹, Ewa Paschalewicz^{1,2}, Anakin N. Iwehli¹, Jeneeni Govindaswamy¹, Véronique Zeller-Péronnet¹, Sandra Scheuring¹, Heine Quast¹, Volke Friedrichsdorf¹, Greta Götz¹, Florian Priller¹, Jero Grunert¹, Frieda Jørgensen¹, Miriam Koenig¹, Janna Kovacs¹, Sonja Lück¹, Elisabeth Bédouret¹



Rapid determination of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* in food products by loop-mediated isothermal amplification coupling propidium monoazide treatment

Melien Petersen¹, Linnéa Me¹, Xiaonan Lu^{1,2}, A. Inke F. Wulsten¹

ORIGINAL RESEARCH article
Front. Microbiol., 17 June 2020
Sec. Food Microbiology
Volume 11 - 2020 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01037>

Underestimated Survival of *Campylobacter* in Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery

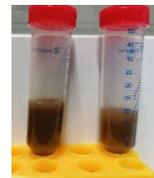
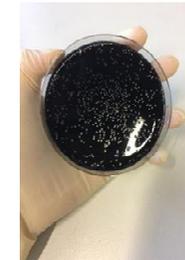
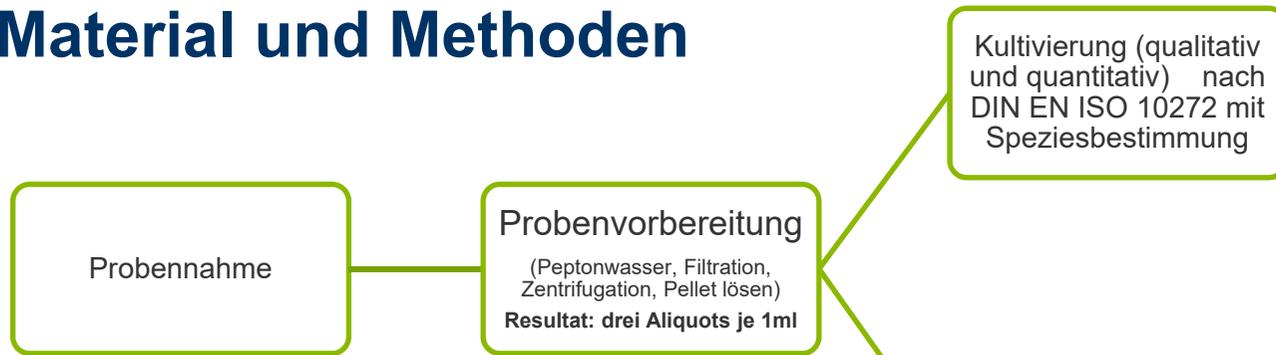
Inke F. Wulsten¹, Alibek Galeev², Kerstin Stingl¹

¹ National Reference Laboratory for *Campylobacter*, Department of Biological Safety, German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany
² Institute of Medical Microbiology and Hospital Epidemiology, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

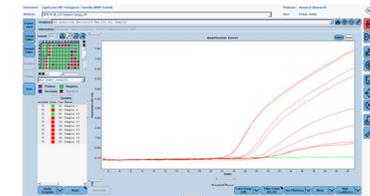
Studiendesign

- A** **Praxisversuch**
Beprobung von drei konventionellen Masthähnchenbetrieben
- B** **Experimentelle Studie Hühnermist**
Beprobung Mistmatten von *Campylobacter-positiven* Tieren aus experimentellen Studie
- C** **Laborexperimentelle Studie**
Verhalten von *Campylobacter* in Wasser und Erde
-Kultivierungsfähigkeit, VBNC, Induktion des VBNC-Status-

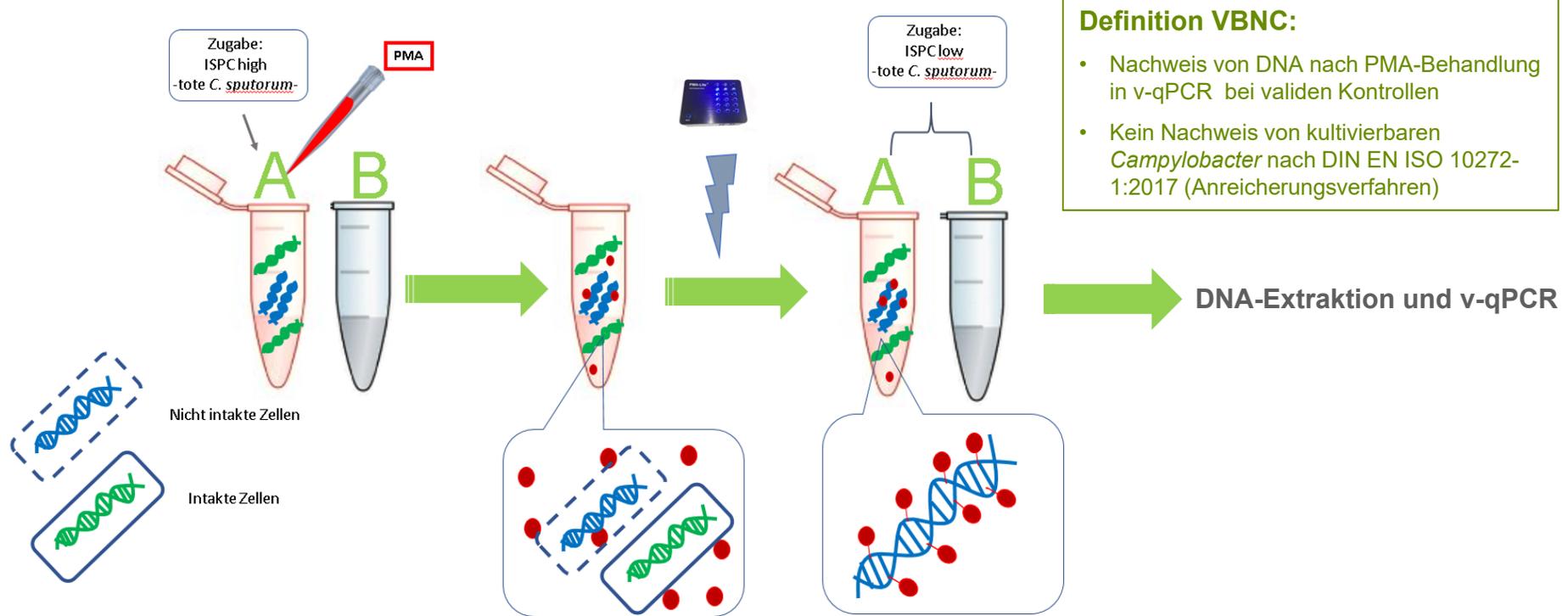
Material und Methoden



Viable qPCR
(Pacholewicz et al., 2019)



Material und Methoden



(Pacholewicz et al., 2019)

A: Praxisversuch

- Insgesamt 7 Probenahmezeitpunkte in drei Betrieben mit 186 Proben

Proben in zwei Ställen pro Betrieb
(vier Proben je Zeitpunkt)

Proben in der Umwelt
(22-24 Proben je Zeitpunkt)

- Vier Probenahmezeitpunkte waren positiv (im Stall) → dafür Ergebnissdarstellung
- bei drei Zeitpunkten alle Proben im Stall und Umwelt negativ (CFU und v-qPCR)

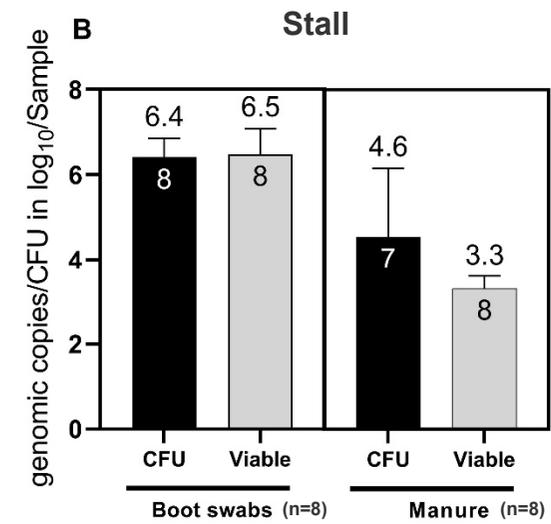


- 2 x Sockentupfer
- 2 x Mistmatte

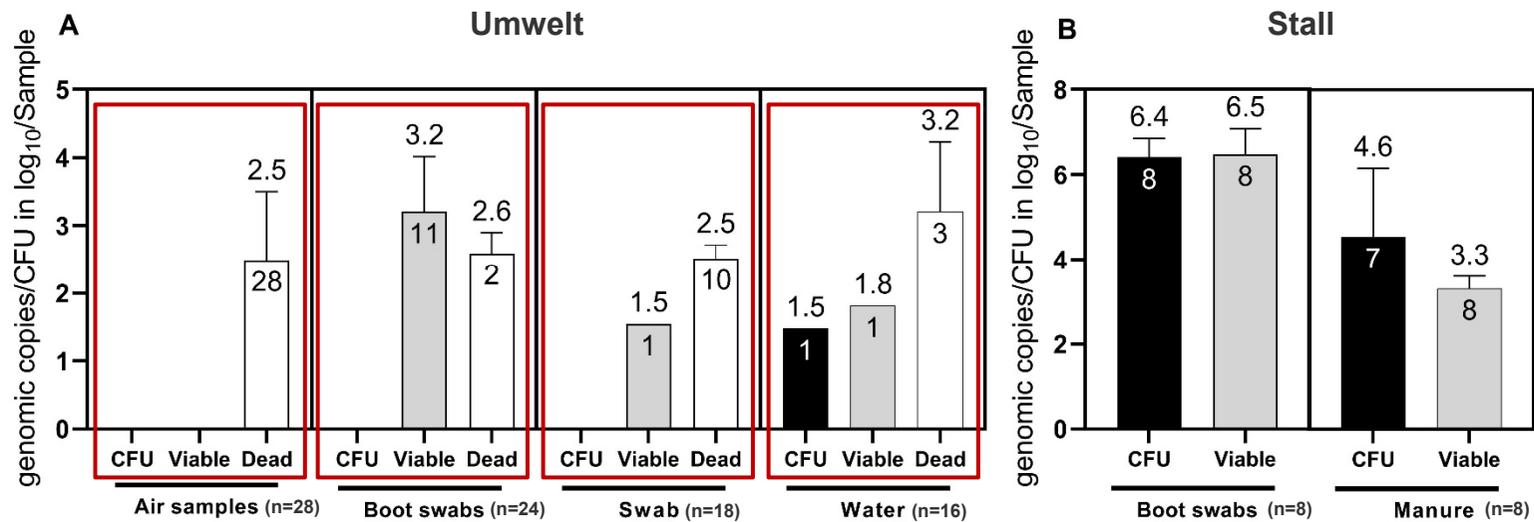
- Sockentupfer
- Gazetupfer
- Luft
- Wasser



A: Praxisversuch - Ergebnisse



A: Praxisversuch - Ergebnisse



- In 12/86 (14%) Umweltproben Detektion von VBNC-*Campylobacter*
- nur in Sockentupferproben und Gazetupfern

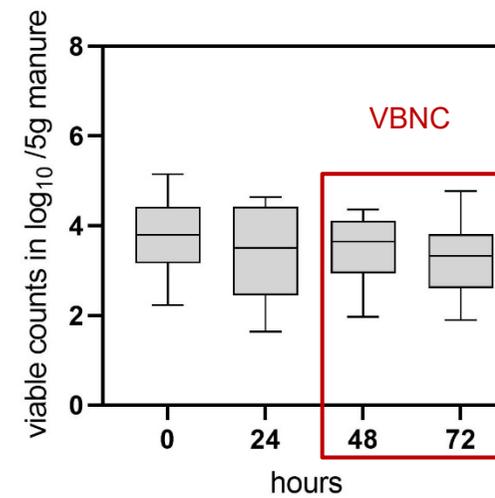
B: Experimentelle Studie Hühnermist

- Vier Ställe nach Ausstallung einer *Campylobacter*-positiven Tiergruppe (*C. jejuni* – BfR-CA-14430)
- Vier Lokalisationen in der Mistmatte
- Vier Probenahmezeitpunkte: 0, 24, 48 und 72 Stunden



B: Tierexperimentelle Studie - Ergebnisse

- zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden *Campylobacter* im Anreicherungsverfahren kultivierbar, nicht quantifizierbar
- ab Zeitpunkt 48 Nachweis von VBNC-*Campylobacter*



C: Laborexperimentelle Studie

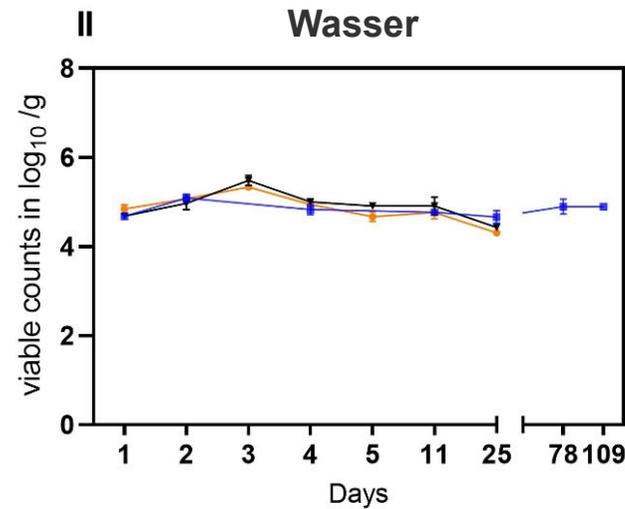
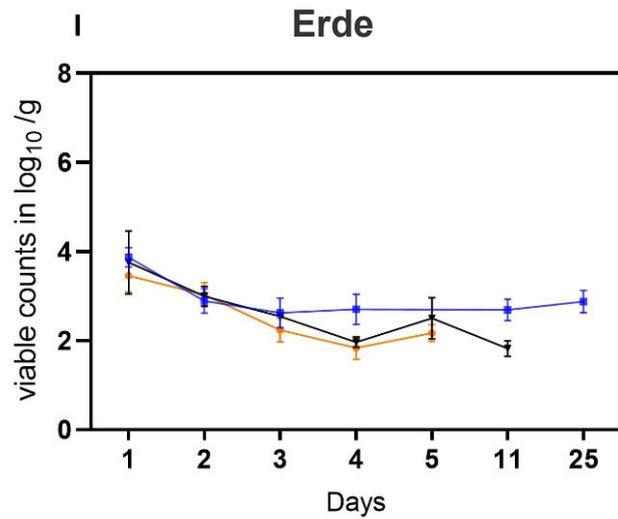
- zwei Umweltmatrices: Erde + Wasser
 - Erde: sandig, pH 7.0
 - Wasser: Trinkwasser, pH 7.0
- drei Bedingungen: 22°C, trocken (35% Luftfeuchte)
22°C, feucht (98% Luftfeuchte)
4°C, mittlere Feuchte (65%)
- drei biologische Replikate parallel
- Fragestellungen:

Wie bleiben VBNC-*Campylobacter* in Umweltmatrices stabil?
Wie lange lassen sich kultivierungsfähige *C. jejuni* nachweisen?
Wann gehen sie ggf. in den VBNC-Status über?



C: Laborexperimentelle Studie - Ergebnisse

- VBNC *C. jejuni* – BfR-CA-14430 eingemischt

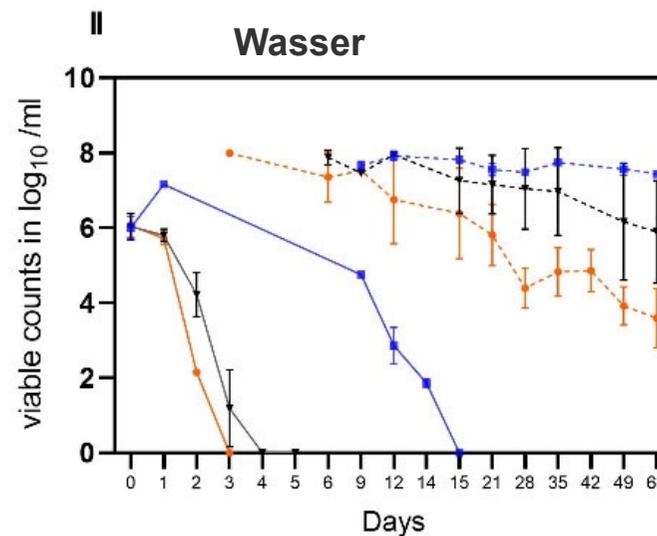
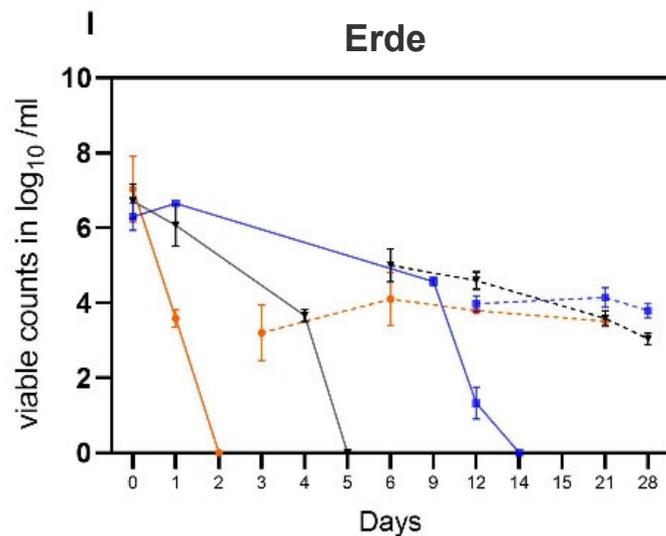


 VBNC-Campylobacter
 VBNC-Campylobacter
 VBNC-Campylobacter

Orange: 22°C, 35% Luftfeuchte
Schwarz: 22°C, 98% Luftfeuchte
Blau: 4°C, 65% Luftfeuchte

C: Laborexperimentelle Studie - Ergebnisse

- kultivierbarer *C. jejuni* – BfR-CA-14430 eingemischt



— kultivierbare
— *Campylobacter*
- - - VBNC-*Campylobacter*
- - -

 **microorganisms** 

Article
Detection of Viable but Non-Culturable (VBNC)-*Campylobacter* in the Environment of Broiler Farms: Innovative Insights Delivered by Propidium Monoazide (PMA)-v-qPCR Analysis

Benjamin Reichelt¹, Vanessa Szott², Kerstin Stingl³, Uwe Roesler¹ and Anika Friese^{1,4}

Orange: 22°C, 35% Luftfeuchte
 Schwarz: 22°C, 98% Luftfeuchte
 Blau: 4°C, 65% Luftfeuchte

Zusammenfassung

- Versuche im experimentellen Ansatz zeigen das Potential einer Induktion von VBNC-*Campylobacter* in der Umwelt unter verschiedenen Bedingungen
- lange Stabilität der VBNC-*Campylobacter* in den Umweltmatrices
- eine sehr gute Probenvorbereitung bei Umweltmatrices ist ausschlaggebend für den Erfolg der Methode
- Bewertung hinsichtlich der Relevanz von VBNC-*Campylobacter* für die Kolonisierung von Masthühner schwierig

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Benjamin Reichelt



Team Tier- und Umwelthygiene



Danke an den gesamten PAC-Campy-Verbund



Danke an die Landwirt*innen für die Teilnahme



Förderung durch:

